



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FISICO-QUIMICAS Y NATURALES

Tesis para acceder al título de Doctor en Ciencias Químicas

**NUEVOS MATERIALES PARA EL MEJORAMIENTO DE
LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL**

**Desarrollo y Optimización de Reacciones con Levaduras y
Enzimas Inmovilizadas**

Ing. Mulko, Lucinda E.

Director: Acevedo, Diego F.
Co-Directora: Rivarola, Claudia R.

Diciembre 2017

A mis padres

COMISION ASESORA

Nombre y Apellido:.....Lugar de Trabajo:.....

Nombre y Apellido:.....Lugar de Trabajo:.....

Nombre y Apellido:.....Lugar de Trabajo:.....

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:.....

Calificación:.....

JURADO

Nombre y Apellido:.....Aclaración:.....

Nombre y Apellido:.....Aclaración:.....

Nombre y Apellido:.....Aclaración:.....

Resumen

La producción de bioetanol involucra las etapas de licuefacción y sacarificación del almidón, con la posterior fermentación anaeróbica de los azúcares más simples por parte de levaduras. Previo proceso de fermentación, los azúcares deben estar disponibles en el medio de reacción para ser metabolizados por levaduras, para esto, se usan las enzimas α y gluco-amilasa. En el proceso de producción clásico tanto enzimas como levaduras, son adicionadas a la mezcla de reacción y permanecen suspendidas libremente en el medio, con lo cual resulta dificultoso de ser operado de forma continua e imposibilita la reutilización de los catalizadores. En consiguiente, los niveles de rentabilidad del proceso de producción de bioetanol convencional son bajos. Así surge la necesidad de estudiar distintas opciones que posibiliten el aumento de la productividad del proceso, permitan altos rendimientos de producto, disminuyan costos y tiempos de operación.

En la presente tesis doctoral se demuestra que el empleo de enzimas y levaduras inmovilizadas en una matriz polimérica y monolítica, ofrece múltiples mejoras y no implica cambios radicales en el proceso de producción. Para tal fin, se inmovilizaron enzimas alfa y gluco-amilasa y levaduras *S. cerevisiae* como bio-catalizadores utilizados industrialmente en el proceso de producción de bioetanol. Se estudiaron distintas matrices de inmovilización, particularmente hidrogeles de poliacrilamida macro y microporosos, y acrilamidas co-polimerizadas con otros monómeros vinílicos y nanocompuestos poliméricos de hidrogeles-óxido de grafeno. También se analizó el uso como matriz de inmovilización de un bio-polímero de origen natural (alginato). Además, se utilizaron diversas técnicas de inmovilización: inmovilización por atrapamiento, inmovilización por adsorción superficial y por encapsulación. Los distintos procedimientos de preparación e inmovilización fueron comparados con los componentes activos libres, en las reacciones de hidrólisis-sacarificación y fermentación, involucradas en la producción de bioetanol. Las mejores condiciones de síntesis fueron seleccionadas analizando parámetros tales como: incorporación del componente activo a la matriz, estudios de resistencia mecánica y estabilidad química, análisis de impedimentos difusionales y condiciones de reacción (tanto de hidrólisis-licuefacción para enzimas como fermentación para levaduras).

Para la inmovilización de enzimas alfa y gluco amilasa se analizó la actividad enzimática en las reacciones de hidrólisis-sacarificación. Se determinaron los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten. Los valores de actividad enzimática, durante ambas reacciones, pronostican reacciones algo más lentas inicialmente para enzimas inmovilizadas en hidrogeles respecto a las enzimas libre. Sin embargo, la posibilidad de reutilización y el mantenimiento de la capacidad catalíticas de enzimas inmovilizadas resultan en grandes ventajas operativas.

Las levaduras fueron retenidas de manera eficiente en hidrogeles monolíticos, presentando excelentes propiedades mecánicas y alta viabilidad celular reforzadas por un sistema nanocompuesto de hidrogel y oxido de grafeno. Durante la reacción de fermentación, hidrogeles macroporosos mostraron un transporte masivo rápido permitiendo que los sistemas hidrogel-levaduras alcancen rendimientos y productividades de etanol similares a las levaduras libres. Por otra parte, las mismas levaduras fueron capaces de mantener su actividad por hasta cinco ciclos de reacción. Respecto a la temperatura de operación, levaduras inmovilizadas lograron soportar activamente hasta una temperatura de trabajo 10 °C superior a la máxima soportada por levaduras libres. También se mostraron más resistentes a la presencia de etanol (aunque por tiempos limitados) y respondieron en forma positiva al incremento de glucosa inicial en el sistema. Por último, se estudió un sistema que involucra la inmovilización simultánea de enzimas y levaduras mediante el uso de un programa de Diseño Experimental, logrando su optimización en el sistema de producción de bioetanol.

En conclusión, matrices de hidrogeles de poliacrilamida reforzadas con oxido de grafeno (nanocompuestos), ofrecen múltiples posibilidades al implementarse como matrices de inmovilización de biocatalizadores para la producción de bioetanol. El particular carácter monolítico y macroporoso de estos hidrogeles los hace especialmente adecuados para salvar tres dificultades, frente a otras matrices de inmovilización: la facilidad de reutilización, la mayor tolerancia a condiciones medioambientales adversas y el atrapamiento del componente activo durante un periodo prolongado de tiempo.

Abstract

Bioethanol production involves three main stages, liquefaction and saccharification of starch, following by sugar anaerobic fermentation by yeast. Prior to the fermentation process, sugars must be available in the reaction medium to be metabolized by yeasts. For this reason, specific enzymes are also used. In the classical bioethanol process enzymes and yeasts are added to the reaction mixture where they are freely suspended making it difficult to operate in a continuous way impeding the catalysts reuse. Consequently, the effectiveness levels of the conventional process are low. Thus, the need to study different options is arising to increase productivity, allow high product yields and decrease operating costs.

In the present thesis, it is demonstrated that the use of immobilized enzymes and yeasts in a polymeric matrix offers several improvements without provoking radical changes in the production process. For this purpose, alpha and gluco-amylase enzymes and *S. cerevisiae* yeasts as biocatalysts industrially used in the bioethanol production process were immobilized inside different matrices of polyacrylamide hydrogels, acrylamides co-polymerized with vinyl monomers and hydrogel-graphene oxide nanocomposites (macroporous and microporous) were studied. The possibility of using a bio-polymer of natural origin (alginate) as an immobilization matrix was also analyzed. In addition, various immobilization techniques were used. The different preparation and immobilization procedures were compared with the free active compounds in the hydrolysis-saccharification and fermentation reactions. The best synthesis conditions were selected after analyzing parameters such as: immobilization efficiency, mechanical resistance and chemical stability, matrix diffusion impediments analysis and experimental conditions.

For enzymes immobilized, the enzymatic activity was analyzed in the hydrolysis-saccharification reactions. The results of enzymatic activity predict slower rate reaction for enzymes immobilized compare to free enzymes. However, the possibility of reuse and maintenance of the high catalytic capacity of immobilized enzymes result in important operational advantages.

The yeasts were efficiently retained in monolithic macroporous hydrogels, presenting excellent mechanical properties and high cell viability which were reinforced by hydrogel-graphene oxide nanocomposite. During the fermentation reaction, macroporous hydrogels showed fast mass transport allowing the hydrogel-yeast system reach yields and productivities similar to free yeasts. Likewise, the immobilized yeasts were able to maintain their activity for up to five reaction cycles. Besides, immobilized yeasts were able to actively withstand up to a working temperature of 10 °C higher than the maximum allowed by free yeasts; these were also more resistant to the presence of ethanol (although for limited times) and responded positively to the initial glucose increase in the system.

Finally, a biocatalytic system which involves the immobilization of enzymes and yeasts simultaneously was studied using a *Desing of Experiment Software*, achieving the operation variables optimization for the bioethanol production system.

In conclusion, polyacrylamide hydrogels reinforced with graphene oxide (nanocomposite) offer multiple possibilities to apply it as immobilization matrices of bio-catalysts for the bioethanol production. The particular monolithic and macroporous character of these hydrogels become them perfectly suitable for overcome three difficulties compared to other immobilization matrices: reusability, greater tolerance to adverse environmental conditions and an effective immobilization of active components.

Índice

Índice de Contenidos

Glosario	1
1. Objetivos	3
1.1. Objetivo General	3
1.2. Objetivos Específicos	3
2. Introducción y Antecedentes	4
2.1. Perspectiva Histórica de los Biocombustibles	4
2.2. Clasificación de Biocombustibles según su Tecnología de Producción.....	5
2.3. Etanol como Biocombustible.....	6
2.4. Materias Primas Involucradas en la Producción de Bioetanol	7
2.4.1. Almidón: la Materia Prima por Excelencia	7
2.4.2. Otras Fuentes de Bioetanol: Celulosa, Hemicelulosa, Lignina y Pectina.....	8
2.5. Proceso de Producción de Bioetanol	11
2.5.1. Pretratamiento de la Materia Prima	11
2.5.2. Reacciones de Licuefacción y Sacarificación.....	12
2.5.3. Fermentación	13
2.5.4. Destilación.....	14
2.6. Conceptos Básicos.....	14
2.6.1. Inmovilización de Células y/o Enzimas para la Producción de Bioetanol	14
2.6.2. Perspectiva Histórica de Hidrogeles y sus Derivados	17
2.6.3. Técnicas de Inmovilización.....	18
2.7. Síntesis de Matrices de Inmovilización de Enzimas y Levaduras	21
2.7.1. Hidrogeles Poliméricos Basados en Acrilamida.....	21
2.7.2. Preparación de Hidrogeles: Polimerización Radicalaria	22
2.7.3. Crio-polimerización: Preparación de Hidrogeles Macroporosos.....	26
2.8. Alginato como Matriz de Inmovilización.....	27

3.	Inmovilización Enzimática	30
3.1.	Introducción	30
3.1.1.	Las Enzimas	30
3.1.2.	Cinética y Actividad Enzimática.....	30
3.2.	Materiales y Métodos Experimentales	34
3.2.1.	Materiales.....	34
3.3.	Métodos de Análisis y Caracterización.....	43
3.4.	Resultados y Discusiones.....	57
3.4.1.	Selección de las Matrices de Inmovilización	57
3.4.2.	Caracterización de Matrices con Enzimas Inmovilizadas.....	57
3.4.3.	Análisis de Hinchamiento (Swelling) de Matrices de Inmovilización.....	60
3.4.4.	Propiedades Mecánicas	63
3.4.5.	Eficiencia de Inmovilización Enzimática.....	66
3.4.6.	Capacidad de retención enzimática.....	67
3.4.7.	Análisis mediante Espectroscopia FT-IR.....	69
3.4.8.	Cinética Enzimática de α -amilasa	71
3.4.9.	Cinética Enzimática de β -amilasa	81
3.5.	Conclusiones Parciales.....	85
4.	Levaduras Inmovilizadas	86
4.1.	Introducción y Antecedentes.....	86
4.1.1.	Levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	86
4.1.2.	Etapas de Crecimiento Celular: Levaduras	87
4.1.3.	Estrés en Levaduras	89
4.1.4.	Limitaciones del Proceso de Fermentación.....	92
4.2.	Materiales y Métodos Experimentales	93
4.2.1.	Materiales.....	93
4.2.2.	Métodos de Análisis y Caracterización.....	95
4.3.	Resultados y Discusiones.....	109

4.3.1.	Caracterización de Levaduras Inmovilizadas	109
4.3.2.	Microscopía de Barrido Electrónico (SEM)	109
4.3.3.	Cinética de Hinchamiento	111
4.3.4.	Eficiencia de Inmovilización Celular	114
4.3.5.	Caracterización Mecánica: Análisis Mecánico Estático.....	115
4.3.6.	Viabilidad Celular	116
4.3.7.	Selección de Matrices de Inmovilización Celular	118
4.3.8.	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Termogravimetría (TGA).....	118
4.3.9.	Reacción de Fermentación.....	120
4.4.	Conclusiones Parciales	133
5.	Inmovilización Simultánea de Enzimas y Levaduras	136
5.1.	Introducción.....	136
5.1.1.	Reacciones “One-pot”	136
5.1.2.	Diseño de Experimentos.....	136
5.2.	Materiales y Métodos	138
5.2.1.	Materiales	138
5.2.2.	Métodos de Análisis y Caracterización: Hidrogeles Tri-componentes: Levaduras y Enzimas Inmovilizadas	141
5.3.	Resultados y Discusiones	143
5.3.1.	Diseño de Experimentos.....	143
5.3.2.	Análisis Estadístico: Análisis de Varianza y Superficie de Respuesta.....	145
5.3.3.	Optimización del Sistema Inmovilizado Enzimas-Levaduras	161
5.4.	Conclusiones Parciales	164
6.	Análisis de Sustentabilidad Ambiental o Greenness	166
6.1.	Introducción.....	166
6.2.	Análisis de Sustentabilidad Eco-Scale y Green Star para α -Amilasa Libre e Inmovilizada.	167
6.3.	Conclusiones Parciales	170
7.	Conclusiones	172

Anexo I: Otros Materiales como Matrices de Inmovilización	174
I.1. Síntesis de otros Hidrogeles Derivados de Monómeros Vinílicos	174
I.1.1. Síntesis y Selección de Hidrogeles como Matrices de Inmovilización.....	174
I.1.2. Síntesis de hidrogeles PNIPAM, PNIPAM-co-AMPS y PNIPAM-co- HMA.....	174
I.1.3. Síntesis de hidrogeles de PAAm y PAAm-co-AA.....	175
I.2. Criterios de Selección de Matrices de Inmovilización.....	177
I.2.1. Criterio I: Resistencia Mecánica	177
I.2.2. Criterio II: Resistencia Química.....	177
I.2.3. Criterio III: Capacidad de Incorporación-Liberación de Componentes Activos	178
I.2.4. Criterio IV: Costos Económicos de Insumos	179
Anexo II: Soluciones Buffer	182
Anexo III: Puntos de Penalización de Eco-Scale.....	184
Referencias.....	186

Índice de Tablas

Tabla 1: Composición de PAAm y PAAm-Amy por IPA. En todos los casos: TEMED, 10 mL L ⁻¹	38
Tabla 2: Composición molar y contenido enzimático de PAAm-Amy por IA. Para todos los casos: TEMED, 10 mL L ⁻¹	40
Tabla 3: Composición y contenido enzimático de perlas de alginato con enzimas inmovilizadas. Para todos los casos la gelificación se llevó a cabo en Ca ₂ Cl 0,5 M.	41
Tabla 4: Composición de hidrogeles de PAAm-GO-Amy.	43
Tabla 5: Matrices caracterizadas para inmovilización enzimática de α -amilasa	57
Tabla 6: Hinchamiento en equilibrio y velocidad inicial de hinchamiento para matrices de inmovilización con y sin enzimas.	63
Tabla 7: Propiedades mecánicas para matrices de inmovilización con y sin enzimas.....	66
Tabla 8: Eficiencia de inmovilización para matrices con enzimas inmovilizadas.....	67
Tabla 9: Parámetros cinéticos de Michaelis-Menten obtenidos mediante Lineweaver-Burk para enzimas libres e inmovilizadas. Concentración enzimática: 2,96 x 10 ⁻⁴ g mL ⁻¹	76

Tabla 10: Parámetros cinéticos de Michaelis-Menten obtenidos mediante regresión no lineal para enzimas libres e inmovilizadas. Concentración enzimática: $2,96 \times 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$	77
Tabla 11: Cinética de la reusabilidad enzimática durante la reacción de hidrólisis de almidón [S]. Concentración inicial de almidón de $0,146 \text{ g L}^{-1}$	80
Tabla 12: Parámetros cinéticos de Michaelis-Menten para enzimas β -amilasas libres e inmovilizadas en hidrogeles de poliacrilamida.	83
Tabla 13: Hidrogeles de poliacrilamida (AAM 1 M) con levaduras <i>S. cerevisiae</i> (PAAM-Sc). ...	95
Tabla 14: Fermentación de etanol a partir de glucosa variando concentración inicial de glucosa y temperatura de reacción. En todos los casos el pH del medio de cultivo fue de 7,2 y la velocidad de agitación de 250 rpm.	103
Tabla 15: Condiciones experimentales para fermentación de etanol a partir de glucosa utilizando diferentes cargas <i>S. cerevisiae</i> en hidrogeles.....	104
Tabla 16: Condiciones experimentales para fermentación de etanol a partir de glucosa utilizando diferentes morfologías de matrices de inmovilización <i>S. cerevisiae</i> en hidrogeles. En todos los casos el pH del medio de cultivo fue de 7,2 y la velocidad de agitación de 250 rpm.	104
Tabla 17: Condiciones experimentales para fermentación de etanol a partir de glucosa. Análisis de la reusabilidad. En todos los casos el pH del medio de cultivo fue de 7,2, la velocidad de agitación de 250 rpm y $T = 42^\circ \text{C}$	105
Tabla 18: Condiciones experimentales para fermentación anaeróbica de etanol a partir de glucosa en levaduras inmovilizadas. Análisis de tolerancia a exposición de etanol y tiempo de exposición a etanol.	106
Tabla 19: Condiciones experimentales de ciclos consecutivos de fermentación de etanol a partir de glucosa utilizando <i>S. cerevisiae</i> en hidrogeles de poliacrilamida. Para todos los casos $\text{pH} = 7,2$; $T = 42^\circ \text{C}$ y $\omega_{\text{mix}} = 250 \text{ rpm}$	108
Tabla 20: Eficiencia de inmovilización e hinchamiento en equilibrio para hidrogeles de poliacrilamida y PAAM-Sc con diferente carga de <i>S. cerevisiae</i>	113
Tabla 21: Eficiencia de inmovilización de hidrogeles PAAM-2 y PAAM-Sc con diferente carga celular.	115
Tabla 22: Módulos de elasticidad de hidrogeles PAAM-2 y PAAM-Sc con diferente carga celular.	115
Tabla 23: Viabilidad celular para diferentes cargas de levadura <i>S. cerevisiae</i> en hidrogeles de poliacrilamida.	117
Tabla 24: Análisis de la temperatura de reacción. Resultados de ciclos de fermentación de etanol a partir de glucosa con <i>S. cerevisiae</i> . Para todos los casos: $\text{pH} 7,2$ y glucosa inicial 3 % p/v.	121

Tabla 25: Análisis de concentración de glucosa inicial Resultados de ciclos cortos de fermentación de etanol utilizando <i>S. cerevisiae</i>	124
Tabla 26: Condiciones experimentales para fermentación de etanol a partir de glucosa utilizando diferentes cargas <i>S. cerevisiae</i> en hidrogeles. Condiciones de reacción: 42°C; pH 7,2; 3 % p/v.	125
Tabla 27: Condiciones experimentales para fermentación de etanol a partir de glucosa utilizando diferentes morfologías <i>S. cerevisiae</i> en hidrogeles. Condiciones de reacción: 42°C; pH 7,2; 3 % p/v.	125
Tabla 28: Análisis de la tolerancia a exposición de etanol y tiempo de exposición a etanol. Condiciones de análisis: 42°C; pH 7,2; 3 % p/v.	126
Tabla 29: Primer ciclo de fermentación de PAAM-Sc-6. Condiciones iniciales: 1 g de <i>S. cerevisiae</i> (100 cápsulas), 0,30 g 100 mL ⁻¹ de glucosa inicial, 42 ° C, 250 rpm.	127
Tabla 30: Ciclos de fermentación de la levadura libre e inmovilizada (PAAM-Sc-6), Los valores máximos de etanol producido y la concentración de glucosa consumida, el rendimiento de etanol, y el porcentaje de etanol rendimiento teórico y la productividad volumétrica, Los ciclos iniciales 1, 2, 3: 1 g S, <i>cerevisiae</i> (100 Uds.), 30 g L ⁻¹ de glucosa, 42 ° C, 250 rpm, Ciclos 4: 100 g L ⁻¹ de glucosa, Ciclos 5: 150 g L ⁻¹ de glucosa.....	132
Tabla 31: Análisis de viabilidad celular para ciclos de fermentación de la levadura libre e inmovilizada (PAAM-Sc-6). Los ciclos iniciales 1, 2, 3: 1 g S, <i>cerevisiae</i> (100 Uds.), 30 g L ⁻¹ de glucosa, 42 ° C, 250 rpm, Ciclos 4: 100 g L ⁻¹ de glucosa, Ciclos 5: 150 g L ⁻¹ de glucosa	133
Tabla 32: Hidrogeles de poliacrilamida con levaduras y enzimas inmovilizadas.	141
Tabla 33: Variables de optimización, valores de trabajo. Reacciones de licuefacción, sacarificación y fermentación para levaduras y enzimas simultáneamente inmovilizadas.	142
Tabla 34: Diseño experimental multivariado para el proceso de producción de etanol mediante hidrogeles con levaduras y enzimas inmovilizadas.	144
Tabla 35: ANOVA para respuesta en concentración de etanol para producción de etanol mediante PAAM-Sc-GAa-2. GL = Grados de Libertad.....	146
Tabla 36: ANOVA para respuesta de productividad volumétrica el proceso de producción de etanol mediante hidrogeles con levaduras y enzimas inmovilizadas (PAAM-Sc-GAm-2). GL= grados de libertad.	151
Tabla 37: ANOVA para respuesta de consumo de glucosa durante el proceso de producción de etanol mediante hidrogeles con levaduras y enzimas inmovilizadas (PAAM-Sc-GAm-2). GL= Grados de Libertad.....	156
Tabla 38: Criterios de optimización para producción de bioetanol utilizando PAAM-Sc-GAm-2.	161

Tabla 39: Soluciones de optimización, objetivo maximizar productividad y concentración de etanol para producción de bioetanol mediante PAAM-Sc-GAM-2.	163
Tabla 40: Eco-Scale para reacción de licuefacción empleando levaduras libres e inmovilizadas.	168
Tabla 41: <i>Green Star</i> tabla de evaluación para reacción de licuefacción vía α -amilasa para enzimas libre (Free-Amy), PAAM-Amy-6 y Alg-Amy-2. 3-Puntaje máximo, 1-Puntaje mínimo.	169
Tabla 42: Composición molar de hidrogeles de poli-acrilamida y derivados vinílicos.	176
Tabla 43: Condiciones operativas de las reacciones de producción de bioetanol	177
Tabla 44: Ensayos de retención-liberación enzimática de hidrogeles	179
Tabla 45: Selección de hidrogeles sintetizados de poli-acrilamida y derivados vinílicos.....	181

Índice de Figuras

Figura 1: Estructura general de polisacáridos del almidón amilopectina y amilosa.	8
Figura 2: a) Estructura química de la α -D-glucosa b) formación de enlaces α -(1-4) glicosídicos y enlaces α -(1-6) glicosídicos.....	8
Figura 3: Estructura química de la celulosa.	9
Figura 4: Estructuras químicas de celulosa, hemicelulosa y pectina.	10
Figura 5: Diagrama de bloques del proceso de producción de bioetanol.....	11
Figura 6: Producción de bioetanol etapas de licuefacción, sacarificación y fermentación.	12
Figura 7: Técnicas de inmovilización enzimática y celular más importantes. (Mulko et al., 2017)	20
Figura 8: Transición de fase de un hidrogel frente a un cambio en la temperatura.(Smart hydrogels, 2013).....	22
Figura 9: Etapas de polimerización radicalaria para monómero e iniciadores genéricos (Molina, 2011).....	23
Figura 10: Estructura química de monómeros y co-monómeros vinílicos.....	24
Figura 11: Estructuras químicas del sistema iniciador de la polimerización.	25
Figura 12: Formación del radical redox.	25
Figura 13: Mecanismo de iniciación del polímero a partir de un monómero vinílico.	25

Figura 14: Estructura química del entrecruzador.....	26
Figura 15: Etapas de crio-polimerización de un hidrogel.....	27
Figura 16: Estructura química de los monómeros del alginato, ácidos β -D-manurónico (M) y α -L-gulurónico (G). (Lee y Mooney, 2012).....	28
Figura 17: Gelificación de alginato mediante adición de iones calcio. (Sun y Tan, 2013)	28
Figura 18: Estructura química del alginato.....	29
Figura 19: Mecanismo de reacción enzimática. (Wilson, 2010)	32
Figura 20: Tendencia de la cinética de Michaelis-Menten para un sustrato genérico. (Murray y Davis, 2003).....	33
Figura 21: Métodos de inmovilización enzimática.....	35
Figura 22: Estructura del precursor monomérico (izq.) y unidad monomérica repetitiva (der.). ..	36
Figura 23: Inmovilización enzimática por atrapamiento.	37
Figura 24: Enzimas inmovilizadas por adsorción.....	39
Figura 25: Enzimas inmovilizadas en perlas de alginato.....	40
Figura 26: Preparación de láminas de óxido de grafeno.....	42
Figura 27: Esquema de inmovilización de enzimas inmovilizadas en hidrogeles de poliacrilamida-grafeno.	42
Figura 28: Procedimiento experimental para determinación gravimétrica de cinética de hinchamiento.....	44
Figura 29: Procedimiento experimental de medición de eficiencia de liberación enzimática.	46
Figura 30: Reflexión total atenuado (ATR) principio de funcionamiento.....	47
Figura 31: Esquema de funcionamiento de ATR.....	47
Figura 32: Deformación (strain) desarrollado por un material elástico genérico en función de la fuerza de compresión aplicada (stress).	49
Figura 33: Sistema de medición de módulos de elasticidad de hidrogeles cilíndricos	51
Figura 34: Comportamiento viscoelástico. (Menard, 2008)	51
Figura 35: Estructura esquemática del complejo Iodo-almidón. La cadena de amilosa forma una hélice que rodea las unidades de I ₆ . (Tester, Karkalas y Qi, 2004).....	53

Figura 36: Micrografía SEM de PAAm-1.....	58
Figura 37: Micrografía SEM PAAm-Amy-6	58
Figura 38: Micrografía SEM PAAm-GO-Amy-4	59
Figura 39: Micrografía SEM a) perla de Alg-Amy-2 b) superficie perla Alg-Amy-2.	59
Figura 40: Cinética de hinchamiento para matrices de inmovilización sin enzimas PAAm-1 (●) y con enzimas PAAm-Amy-6 (●).	60
Figura 41: Cinética de hinchamiento para matrices de inmovilización sin enzimas PAAm-1 (●), con óxido de grafeno PAAm-GO (●) y con enzimas PAAm-GO-Amy-4 (●).	61
Figura 42: Hinchamiento en equilibrio para hidrogeles de poliacrilamida puros y con distinta carga enzimática polimerizados vía IPA.	63
Figura 43: Gráficos de Fuerza vs. Deformación para matrices de inmovilización con y sin enzimas α -amilasa: PAAm-1 (---), PAAm-Amy-6 (---), PAAm-GO (---) y PAAm-GO-Amy-4 (---).	64
Figura 44: Ensayos de fatiga para matrices de inmovilización con/sin enzimas α -amilasa: PAAm-1 (---), PAAm-Amy-6 (---), PAAm-GO (---), PAAm-GO-Amy-4 (---), Alg-Amy-2 (---), Alg (---).	65
Figura 45: Rendimiento de retención enzimático para matrices de inmovilización con enzimas Alg-Amy-2 (●), PAAm-Amy-4 (●), PAAm-GO-Amy (●).	68
Figura 46: Espectro de emisión de fluorescencia de triptófano de α -amilasa.	68
Figura 47: Rendimiento de retención enzimático para matrices de inmovilización con enzimas PAAm-Amy-6 (■), Alg-Amy-2 (■), (■) PAAm-GO-Amy-4.	69
Figura 48: Espectro FT-IR de hidrogel de poliacrilamida PAAm-1	70
Figura 49: Espectro FT-IR de hidrogel de poliacrilamida con óxido de grafeno PAAm-GO.	70
Figura 50: Espectro FT-IR de hidrogel de poliacrilamida PAAm-Amy-6.....	71
Figura 51: Espectro FT-IR de hidrogel de poliacrilamida PAAm-GO-Amy-4.....	71
Figura 52: Curva de calibración para concentración de glucosa a 505 nm.	72
Figura 53: Cinética enzimática de Free-Amy durante la reacción de hidrólisis para diferentes concentraciones iniciales de almidón. (○) 0,02 g L ⁻¹ , (●) 0,05 g L ⁻¹ , (●) 0,07 g L ⁻¹ (●) 0,1 g L ⁻¹ . 72	
Figura 54: Cinética enzimática de PAAm-Amy-6 durante la reacción de hidrólisis de almidón. para diferentes concentraciones iniciales de almidón. (●) 0,02 g L ⁻¹ , (●) 0,05 g L ⁻¹ , (●) 0,07 g L ⁻¹ (●) 0,10 g L ⁻¹	73

Figura 55: Cinética enzimática de Alg-Amy-2 durante la reacción de hidrólisis de almidón para diferentes concentraciones iniciales de almidón. (○) 0,02 g L ⁻¹ , (●) 0,05 g L ⁻¹ , (●) 0,07 g L ⁻¹ (●) 0,10 g L ⁻¹ .	73
Figura 56: Cinética enzimática de PAAm-GO-Amy-4 durante la reacción de hidrólisis de almidón para diferentes concentraciones iniciales de almidón. (○) 0,02 g L ⁻¹ , (●) 0,05 g L ⁻¹ , (●) 0,07 g L ⁻¹ (●) 0,10 g L ⁻¹ .	74
Figura 57: Regresión lineal de la ecuación de Michaelis-Menten por el método Lineweaver-Burk para Free-Amy (★), Alg-Amy-2 (★), PAAm-Amy-6 (★), PAAm-GO-Amy-4 (★).	76
Figura 58: Regresión no lineal de la ecuación de Michaelis-Menten para Free-Amy (★), Alg-Amy (★), PAAm-Amy (★), PAAm-GO-Amy (★).	77
Figura 59: Reutilización enzimática de Alg-Amy-2 para la hidrólisis del almidón. Concentración inicial de almidón de 0,100 ± 0,005 g L ⁻¹ (●) Ciclo 1, (●) Ciclo 2, (○) Ciclo 3.	78
Figura 60: Reutilización de PAAm-Amy-6 para la hidrólisis del almidón. Concentración inicial de almidón de 0,100 ± 0,005 g L ⁻¹ (●) Ciclo 1, (○) Ciclo 2, (●) Ciclo 3, (●) Ciclo 4, (●) Ciclo 5.	79
Figura 61: Reutilización de PAAm-GO-Amy para la hidrólisis del almidón. Concentración inicial de almidón de 0,100 ± 0,005 g L ⁻¹ (●) Ciclo 1, (○) Ciclo 2, (●) Ciclo 3, (●) Ciclo 4, (●) Ciclo 5.	79
Figura 62: Cinética enzimática para β-amilasa libre reacción de sacarificación, previa reacción de hidrólisis en función de la producción de glucosa para diferentes concentraciones iniciales de almidón. (●) 5 (●) 2 (●) 1 (●) 0,5 g L ⁻¹ .	81
Figura 63: Cinética enzimática para β-amilasa libre. Linealización de los parámetros cinéticos iniciales de acuerdo al método de Lineweaver-Burk.	82
Figura 64: Evolución temporal de la reacción de sacarificación para PAAm-Gmy-3, para diferentes concentraciones iniciales de almidón: (●) 0,5 (●) 1 (●) 2 (●) 5 g L ⁻¹ .	82
Figura 65: Linealización de los parámetros cinéticos de PAAm-Gmy-3 en la reacción de sacarificación.	83
Figura 66: Reusabilidad enzimática para β-amilasa libre para reacción de sacarificación. Evolución temporal de la reacción de sacarificación en función de la producción de glucosa para concentraciones inicial de almidón 0,146 g L ⁻¹ . (●) Ciclo 1, (●) Ciclo 2, (●) Ciclo 3.	84
Figura 67: Productos de fermentación alcohólica de glucosa por acción de <i>S. cerevisiae</i> .	86
Figura 68: Reacciones químicas del metabolismo celular para la degradación de glucosa y fermentación alcohólica. (Bott, 2014).	87
Figura 69: Etapas de crecimiento, maduración y latencia celular de levaduras.	88
Figura 70: Hidrogeles macroporosos de poliacrilamida con <i>S. cerevisiae</i> inmovilizadas por atrapamiento. Estado a) hidratado b) deshidratado.	94

Figura 71: Esquema de trabajo en una cámara de Neubauer. 1) Se adhiere por capilaridad el cubreobjetos a la cámara de conteo. 2) Se siembra la muestra utilizando micropipeta. 3) Se procede al conteo celular en la cuadrícula central seleccionando cuadrantes no consecutivos, mediante microscopio óptico.	99
Figura 72: Representación esquemática de una cuadrícula central (0,2 mm) de la cámara de Neubauer con células vivas y muertas.....	100
Figura 73: Reactor de laboratorio para ciclos de fermentación anaeróbica de 120 min.	101
Figura 74: Esquema del sistema de monitoreo de dióxido de carbono.	102
Figura 75: Bio-reactores de fermentación discontinuos de glucosa mediante <i>S. cerevisiae</i> (a) libres e (b) inmovilizadas PAAm-Sc-6.	107
Figura 76: Micrografías SEM de PAAm-2.	110
Figura 77: Micrografías SEM de PAAm-Sc-6 a) vista ampliada de superficie del hidrogel b) macroporos c) macroporo sin <i>S. cerevisiae</i> d) macroporo con <i>S. cerevisiae</i>	111
Figura 78: Fotografía PAAm-Sc-6 a) Estado deshidratado b) Hinchamiento de equilibrio	112
Figura 79: Cinética de hinchamiento para hidrogeles de poliacrilamida 1M. (●) PAAm-2, (●) PAAm-Sc-3, (●) PAAm-Sc-4, (●) PAAm-Sc-5, (●) PAAm-Sc-6, (●) PAAm-Sc-7 en solución acuosa.	112
Figura 80: Capacidad de hinchamiento de hidrogeles de poliacrilamida en soluciones de agua-etanol. (●) PAAm-2, (●) PAAm-Sc-6.	114
Figura 81: Deformación en función de Esfuerzo para <i>S. cerevisiae</i> inmovilizada. (---) PAAm-2, (- -) PAAm-Sc-3, (- - -) PAAm-Sc-4, (- - -) PAAm-Sc-5, (- - -) PAAm-Sc-6, (- - -) PAAm-Sc-7.	116
Figura 82: Micrografías de a) PAAm-Sc-7 b) PAAm-Sc-6 c) PAAm-Sc-3. Tinción con azul de metileno. Células azules = Células muertas, Células blancas = Células vivas.....	117
Figura 83: Calorimetría diferencial de barrido para hidrogeles de acrilamida puros, (---) PAAm y con levaduras inmovilizadas (- - -) PAAm-Sc-4 Velocidad 10 °C min ⁻¹	118
Figura 84: Termograma TGA (---) PAAm-2 y (- - -) PAAm-Sc-6. % Pérdida de masa (línea continua continua). Derivada primera % pérdida de masa (línea de puntos).	120
Figura 85: Análisis de la temperatura de reacción. Ciclos cortos de fermentación para a) <i>S. cerevisiae</i> (---) 42 °C, (---) 45 °C, (---) 50 °C y (- - -) 65 °C b) PAAm-Sc-6 (---) 42 °C, (- - -) 45 °C, (- - -) 50 °C y (- - -) 65 °C en función del rendimiento de etanol.	121
Figura 86: Análisis de la concentración inicial de glucosa. Ciclos cortos de fermentación para a) <i>S. cerevisiae</i> con [glucosa] ₀ (---) 3 % p/v, (- - -) 10 % p/v, (- - -) 15 % p/v b) PAAm-Sc-6 (- - -) 3 % p/v, (- - -) 10 % p/v, (- - -) 15 % p/v.....	122

Figura 87: Primer ciclo de fermentación para <i>S. cerevisiae</i> libres, (-) Consumo de glucosa (izq.), (-) Concentración de etanol producida (der.).	129
Figura 88: Primer ciclo de fermentación para PAAm-Sc-6, (-) Consumo de glucosa (izq.), (-) Concentración de etanol producida (der.).	129
Figura 89: Ciclo 2 de fermentación para a) <i>S. cerevisiae</i> libre b) PAAm-Sc-6. Ciclo 3 c) <i>S. cerevisiae</i> libre d) PAAm-Sc-6. e) Ciclo 4 PAAm-Sc-6 f) Ciclo 5 PAAm-Sc-6. Para levaduras libres e inmovilizadas. Consumo de glucosa (izq.). (PAAm-Sc-6, <i>S. cerevisiae</i>) Concentración de etanol producida (der.).	131
Figura 90: Posibles superficies de respuesta (a) con curvatura. (b) sin curvatura	137
Figura 91: Sistema de preparación de hidrogeles esféricos por sedimentación.	140
Figura 92: PAAm-Sc-GAa-2.a) Pastillas en estado hidratado b) Pastillas deshidratadas.	141
Figura 93: Superficie de respuesta para concentración de etanol en función de pH (B) y temperatura (A) para producción de etanol con PAAm-Sc-GAM-2. Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados a la izquierda del gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h).	147
Figura 94: Superficie de respuesta para concentración de etanol con PAAm-Sc-GAM-2, en función de velocidad de agitación (C) y temperatura de reacción (A). Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados a la izquierda del gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h).	148
Figura 95: Superficie de respuesta para concentración de etanol en función de tiempo (D) y temperatura (A) con PAAm-Sc-GAM-2. Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados a la izquierda del gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h).	148
Figura 96: Superficie de respuesta para concentración de etanol en función de velocidad de agitación (C) y pH (B) con PAAm-Sc-GAM-2. Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados a la izquierda del gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h).	149
Figura 97: Superficie de respuesta para concentración de etanol con PAAm-Sc-GAM-2, en función del tiempo (D) y pH (B), Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados a la izquierda del gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h).	149
Figura 98: Superficie de respuesta para concentración de etanol con PAAm-Sc-GAM-2, en función de tiempo (D) y velocidad de agitación (C), Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados a la izquierda del gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h).	150
Figura 99: Superficie de respuesta para productividad volumétrica de etanol en función de pH (B) y temperatura (A) con PAAm-Sc-GAM-2, Las variables restantes se mantienen constantes en los	

valores expresados a la izquierda del gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h)..... 152

Figura 100: Superficie de respuesta para productividad volumétrica de etanol en función de temperatura (A) y agitación (C) con PAAm-Sc-GAm-2. Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados a la izquierda del gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h)..... 153

Figura 101: Superficie de respuesta para productividad volumétrica de etanol en función de temperatura y tiempo con PAAm-Sc-GAm-2. Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados a la izquierda del gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h)..... 153

Figura 102: Superficie de respuesta para productividad volumétrica de etanol en función de pH y velocidad de agitación durante el proceso de producción de bioetanol con PAAm-Sc-GAm-2, Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados a la izquierda del gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h),..... 154

Figura 103: Superficie de respuesta para productividad volumétrica de etanol en función de pH y tiempo durante el proceso de producción de bioetanol con PAAm-Sc-GAm-2. Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados a la izquierda del gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h)..... 154

Figura 104: Superficie de respuesta para productividad volumétrica de etanol en función de velocidad de agitación y tiempo de reacción durante el proceso de producción de bioetanol con PAAm-Sc-GAm, Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados en el gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h)..... 155

Figura 105: Superficie de respuesta para consumo (concentración) de glucosa en función de pH y temperatura durante el proceso de producción de bioetanol con PAAm-Sc-GAm-2. Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados en el gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h). 157

Figura 106: Superficie de respuesta para consumo (concentración) de glucosa en función de velocidad de agitación y temperatura durante el proceso de producción de bioetanol con PAAm-Sc-GAm-2. Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados en el gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h). 158

Figura 107: Superficie de respuesta para consumo (concentración) de glucosa en función de tiempo y temperatura durante el proceso de producción de bioetanol con PAAm-Sc-GAm-2. Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados en el gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h). 158

Figura 108: Superficie de respuesta para consumo (concentración) de glucosa en función de pH y velocidad de agitación durante el proceso de producción de bioetanol con PAAM-Sc-GAM-2. Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados en el gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h).....159

Figura 109: Superficie de respuesta para consumo (concentración) de glucosa en función de pH y tiempo de reacción durante el proceso de producción de bioetanol con PAAM-Sc-GAM-2. Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados en el gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h).....159

Figura 110: Superficie de respuesta para consumo (concentración) de glucosa en función de tiempo de reacción y velocidad de agitación durante el proceso de producción de bioetanol con PAAM-Sc-GAM-2. Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados en el gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h).160

Figura 111: Diagrama de barras de optimización, objetivo maximizar productividad y concentración de etanol para producción de bioetanol mediante PAAM-Sc-GAM-2. Deseabilidad combinada 0,667313, Solución N°1.162

Figura 112: Superficie de respuesta para soluciones de optimización, objetivo maximizar productividad y concentración de etanol para producción de bioetanol mediante PAAM-Sc-GAM-2.164

Figura 113: Diagramas de *Green Star*. a) Proceso original b) Proceso alternativo más sustentable (Mayor área cubierta. c) Proceso alternativo menos sustentable (Menor área cubierta).167

Figura 114: Diagramas *Green Star* para licuefacción enzimática vía α -amilasa utilizando a) enzimas libres b) PAAM-Amy-6 c) Alg-Amy-2.....170

Índice de Ecuaciones

Ecuación 1: Expresión matemática de la actividad enzimática:	31
Ecuación 2: Cinética de hinchamiento:.....	44
Ecuación 3: Eficiencia de inmovilización.....	44
Ecuación 4: Eficiencia de liberación enzimática	45
Ecuación 5: Fuerza de compresión por unidad de área.....	50
Ecuación 6: Deformación elástica	50
Ecuación 7: Módulo de elasticidad.....	50

Ecuación 8: Cinética de Michaelis-Menten.....	54
Ecuación 9: Linealización de la cinética de Michaelis-Menten	54
Ecuación 10: Actividad Enzimática	54
Ecuación 11: Eficiencia de inmovilización de levaduras	96
Ecuación 13: Viabilidad Celular	100
Ecuación 14: Densidad Celular	100
Ecuación 15: Rendimiento de Etanol	102
Ecuación 16: Modelo predictivo para respuesta de concentración de etanol para reacciones de producción de bioetanol con PAAm-Sc-GAm-2.....	147
Ecuación 17: Ecuación de predicción para respuesta de productividad volumétrica de etanol, para reacciones de producción de bioetanol con PAAm-Sc-GAm-2.	152
Ecuación 18: Modelo predictivo de superficie de respuesta de consumo de glucosa, para reacciones de producción de bioetanol con PAAm-Sc-GAm-2.	157

Índice de Reacciones

Reacción 1: Reacción de fermentación de glucosa.....	14
Reacción 2: Reacción de Ioduro/triyoduro	52
Reacción 3: Formación del complejo Iodo-Almidón	52
Reacción 4: Oxidación de Glucosa I	55
Reacción 5: Oxidación de Glucosa II	55

Glosario

Abreviatura	Significado
AAM	Acrilamida
Alg	Alginato de Sodio
Alg-Amy	Enzima α -amilasa inmovilizada en perlas de alginato de sodio
APS	Persulfato de amonio
BIS	N, N-metilenbisacrilamida
GS	Green Star
HG	Hidrogel puro (sin levaduras inmovilizadas)
HMA	N-hidroxi-metil acrilamida
IA	Inmovilización por adsorción
IPA	Inmovilización por atrapamiento
LL	Levadura libre
PAAM-Amy	Enzima α -amilasa inmovilizada en hidrogel de poliacrilamida
PAAM-Gly	Enzima β -amilasa inmovilizada en hidrogel de poliacrilamida
PAAM-Sc	Levadura Inmovilizada en hidrogel de poliacrilamida
PAAM-Sc-AGa	Hidrogel de poliacrilamida con enzimas α -amilasa β -amilasa y levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> simultáneamente inmovilizadas
PGS	Solución pre-gelificante
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TEMED	N, N,N',N'-tetrametilendiamina
α-amilasa / Amy	Alfa-amilasa
β-amilasa / Gmy	Glucó-amilasa
NIPAM	N-isopropilacrilamida
AA	Ácido acrílico
GOD	Glucosa oxidasa
POD	Peroxidasa

1. Objetivos

1.1. Objetivo General

Para el desarrollo de la tesis doctoral se propuso sintetizar, estudiar y caracterizar matrices poliméricas aptas para la inmovilización de enzimas y levaduras, biocatalizadores empleados en la producción de bioetanol, con el objetivo de disminuir costos económicos y optimizar el proceso industrial.

1.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar distintos sustratos poliméricos macroporosos y nanoporosos (hidrogeles con entrecruzamientos covalentes o físicos) para ser utilizados como matrices de inmovilización de biocatalizadores.
- Caracterizar fisicoquímicamente los nuevos materiales.
- Inmovilizar levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) y/o enzimas (alfa-amilasa y β -amilasa) dentro de matrices poliméricas.
- Analizar comparativamente las reacciones intervinientes en el proceso de producción de bioetanol utilizando catalizadores clásicos y catalizadores inmovilizados.
- Estudiar la eficiencia de producción de etanol a partir de las levaduras y/o enzimas inmovilizadas en los distintos geles.

2. Introducción y Antecedentes

2.1. Perspectiva Histórica de los Biocombustibles

Etanol y mezclas de etanol-gasolina han sido utilizadas como combustible para vehículos desde los comienzos de la industria automotriz. En el pasado, el suministro de los abundantes y menos costosos combustibles fósiles impidió el desarrollo extensivo de etanol como combustible alternativo. (Naik *et al.*, 2010) Sin embargo, en las últimas décadas y debido a la creciente demanda energética mundial el aumento gradual del costo de los combustibles fósiles y su preocupante impacto ambiental, se ha generado creciente interés por el desarrollo de energías alternativas, más limpias y a un costo competitivo. (Binod *et al.*, 2011; Perez *et al.*, 2011; Cui y Cheng, 2015)

Los biocombustibles han sido propuestos por varios países desarrollados y en desarrollo como una clave para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero (dióxido de carbono, metano), disminuir la dependencia del petróleo importado y estimular el desarrollo rural. (Koh y Ghazoul, 2008) Los biocombustibles son combustibles producidos a partir de plantas, vegetales o residuos comerciales agrícolas, industriales y/o domésticos (biomasa), mediante procedimientos directos o indirectos. (Menon y Rao, 2012)

Del total de la demanda energética mundial, la bioenergía cubre alrededor del 10 %, siendo en 2014 la producción mundial de biocombustibles de aproximadamente 30 mil millones de galones (113 millones de metros cúbicos). En los próximos diez años, se espera que cerca del 25 % de la matriz energética mundial provenga de biocombustibles. (Fischer y Schrattenholzer, 2001) El 60 % de esta manufactura procede de cultivos de maíz y azúcar. Estados Unidos y Sudamérica, entre los que se destaca Brasil, producen más del 65 % del total de los biocombustibles. (Nigam y Singh, 2011)

El bioetanol y el biodiesel son los dos biocombustibles mundiales de transporte sustitutos directos de la gasolina y el combustible diésel derivados del petróleo. Debido principalmente a su amplia disponibilidad, la tecnología de biocombustibles resultará potencialmente en el empleo de más personas que la tecnología basada en combustibles fósiles. (Slade *et al.*, 2014)

En Argentina, el objetivo es homologar el uso de vehículos con motores *flex-fuel* que permiten el uso de bioetanol en cualquier porcentaje, y como en Brasil, lograr la co-existencia del expendio de nafta con bioetanol (hasta un 25-27 %). En cuanto al biodiésel, la principal

meta es reducir las importaciones de *gas-oil* combustible destinado, fundamentalmente, a la generación eléctrica. El biodiésel podría sustituir, al menos en parte, estas importaciones favoreciendo cuestiones ambientales, impulsando la industria local y generando ahorro de divisas. (La Nación, 2016)

2.2. Clasificación de Biocombustibles según su Tecnología de Producción.

Los combustibles obtenidos a partir de fuentes renovables (biocombustibles) pueden clasificarse teniendo en cuenta sus tecnologías de producción como biocombustibles de primera, segunda y tercera generación. (Naik *et al.*, 2010)

Los biocombustibles de primera generación son fabricados a partir de cultivos con alto contenido de aceites, azúcares o almidón. (Binod *et al.*, 2010) La caña de azúcar, el maíz y la soja son las materias primas más utilizadas para la fabricación de estos biocombustibles. Si bien los biocombustibles pueden ser líquidos, sólidos o gaseosos, el término suele emplearse en sentido estricto para referirse sólo a los combustibles líquidos para transporte. (Demirbas, 2009) Las semillas oleaginosas prensadas son la materia prima para biodiésel de primera generación, el aceite obtenido se transforma por trans-esterificación en diésel. El bioetanol se produce con azúcares contenido en diversas materias primas. La principal desventaja de los biocombustibles de primera generación es la utilización de productos alimenticios y tierras cultivables. Los materiales orgánicos, derivados de los biocombustibles de primera generación, deben seguir un modelo de bio-refinería bajo condiciones ambientalmente sostenibles. (Naik *et al.*, 2010)

El desarrollo de biocombustibles de segunda generación procedentes de biomasa no alimentaria ha sido estimulado por los impactos negativos y acumulativos de los biocombustibles de primera generación. La segunda generación de biocombustibles se genera a partir de residuos de madera, paja, residuos industriales y agrícolas. La materia prima también incluye árboles de crecimiento rápido, plantas de rotación y cultivos no alimenticios (como sorgo granífero). (Aditiya *et al.*, 2016)

La obtención de etanol a partir de celulosa se realiza generalmente en dos etapas. El primer paso es la producción de azúcar a partir de los componentes celulósicos y hemicelulósicos (etapa de bajo rendimiento) y la segunda etapa es la fermentación del azúcar (etapa de baja productividad) para producir etanol. Los biocombustibles de segunda generación no producen una gran mejora en comparación con los combustibles de primera

generación teniendo en cuenta la cantidad de combustibles fósiles utilizados para su producción, costos de transporte, aprovechamiento energético y producción, , pero permiten mejorar el equilibrio de dióxido de carbono. (Havlík *et al.*, 2011; Saini *et al.*, 2015)

Los biocombustibles de tercera generación se fabrican a partir de algas marinas utilizando tecnologías de ingeniería genética y nanotecnología. (Jambo *et al.*, 2016) Son un recurso energético alternativo factible que carece de los principales inconvenientes asociados con los biocombustibles de primera y segunda generación. Una mejor materia prima de biocombustibles de tercera generación se obtiene de las microalgas debido a su alta capacidad de fijación de CO₂, su rápida tasa de crecimiento y elevada producción de lípidos. Además, no compiten con los cultivos forrajeros ni con los alimentos, y pueden producirse en tierras no cultivables. Las microalgas presentan un ciclo de recolección muy corto comparado con el cultivo convencional que usualmente se cosecha. Esta situación permite que las cosechas continuas o múltiples aumenten significativamente los rendimientos. (Roesijadi *et al.*, 2010) Actualmente se están desarrollando numerosas técnicas para producir biocombustibles de tercera generación. (Mascarelli, 2009; Borowitzka y Moheimani, 2013) Sin embargo, por el momento no está claro cuándo estas tecnologías serán factible de producir biocombustibles a escala industrial.

2.3. Etanol como Biocombustible

El alcohol etílico (CH₃CH₂OH, PM = 46,7) más conocido como etanol, es un compuesto líquido incoloro, volátil, inflamable y soluble en agua. Las propiedades químicas singulares del etanol están relacionadas con la característica del grupo funcional de los alcoholes: el hidroxilo (-OH), que permite reacciones químicas, tales como deshidratación, recuperación de ésteres, halogenación y oxidación. (McIntire, 2010)

El etanol es ampliamente utilizado en la industria manufacturera, por ejemplo, es uno de los ingredientes más importante en las bebidas alcohólicas producidas por la fermentación de carbohidratos. Cuando se utiliza con fines diferentes a las bebidas alcohólicas, tales como productos de limpieza o combustibles, se desnaturaliza previamente utilizando aditivos orgánicos (metanol, piridina, formaldehído). (Neves *et al.*, 2016) La producción de etanol suele implicar dos métodos diferentes, vía tecnología química o microbiológica. La vía sintética química implica la preparación de etanol por hidratación de etileno, un subproducto de la industria petrolera.

El bioetanol, se refiere a etanol utilizado como fuente de energía y cuya ruta sintética es la fermentación anaeróbica de carbohidratos a partir de materias primas vegetales, mediante microorganismos. (Gupta y Verma, 2015) Históricamente, estas fermentaciones utilizaban levaduras naturales de frutas y azúcares de estas para producir vinos. Las actuales prácticas fermentativas utilizan enzimas específicas y levaduras modificadas genéticamente para soportar condiciones medioambientales adversas e incrementar su longevidad; de forma tal de hidrolizar y fermentar de manera eficiente granos de fuentes amiláceas a glucosa y otras hexosas, que posteriormente serán transformadas en etanol. (Papong y Malakul, 2010)

2.4. Materias Primas Involucradas en la Producción de Bioetanol

2.4.1. Almidón: la Materia Prima por Excelencia

El almidón es el carbohidrato principal contenido en los cultivos de granos como el maíz, el trigo, la papa, etc. y una de las materias primas más populares usadas para la producción de bioetanol. El almidón es un polímero macromolecular, semicristalino a temperatura ambiente, pero experimenta una transición a un estado amorfo (similar al gel) a 80-90 °C debido a un proceso de gelatinización.

El almidón está constituido por dos tipos de polímeros: la amilosa y la amilopectina (Figura 1). La amilosa es un polímero de cadena lineal de moléculas de glucosa (Figura 2) unidas entre sí por enlaces α -(1-4) glicosídicos. La conformación helicoidal es típicamente la estructura primaria de la amilosa. (Buléon *et al.*, 1998) En cuanto a la amilopectina, la principal diferencia estructural con la amilosa es que además de presentar enlaces α -(1-4) glicosídicos también incluye ramas de enlaces α -(1-6) glicosídicos, que tienen lugar cada 24-30 unidades de glucosa. El polímero de amilopectina es el potencialmente hidrolizable por enzimas. (Smirnova *et al* , 2015)

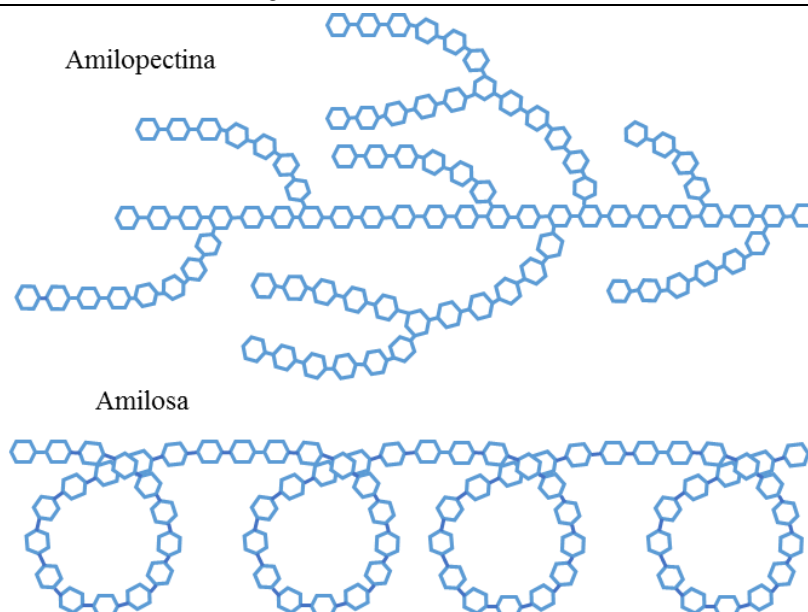


Figura 1: Estructura general de polisacáridos del almidón amilopectina y amilosa.

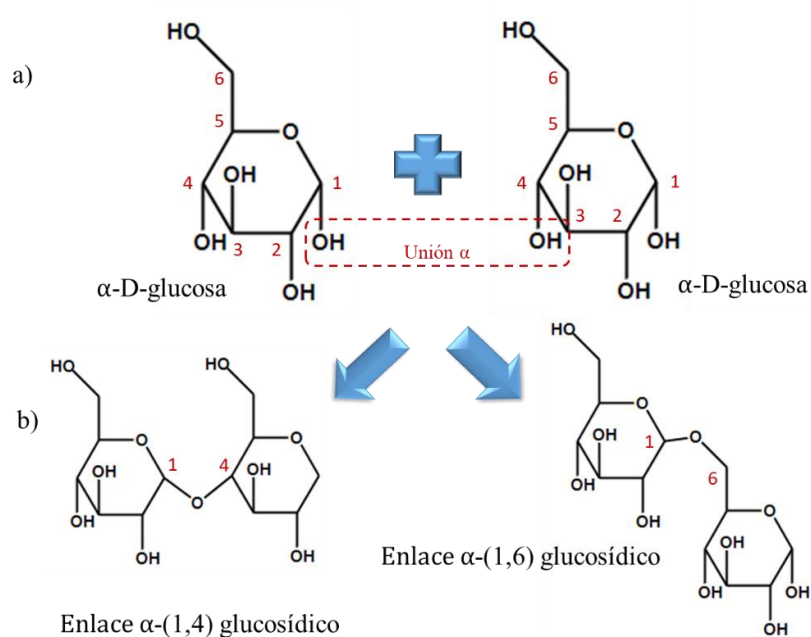


Figura 2: a) Estructura química de la α-D-glucosa b) formación de enlaces α-(1-4) glicosídicos y enlaces α- (1-6) glicosídicos.

2.4.2. Otras Fuentes de Bioetanol: Celulosa, Hemicelulosa, Lignina y Pectina

Si bien el bioetanol procedente de fuentes amiláceas es el más producido, existen otros carbohidratos susceptibles de producir etanol como: celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina. Los primeros tres constituyen la denominada biomasa ligninocelulósica.

La celulosa (Figura 3) es un biopolímero compuesto exclusivamente de moléculas de α -D-glucosa (desde cientos hasta varios miles de unidades). Es la biomolécula orgánica más abundante que forma la mayor parte de la biomasa terrestre. Se forma por la unión de moléculas de α -D-glucosa mediante enlaces β -1,4-glucosídico. Al hidrolizarse totalmente se obtiene glucosa.

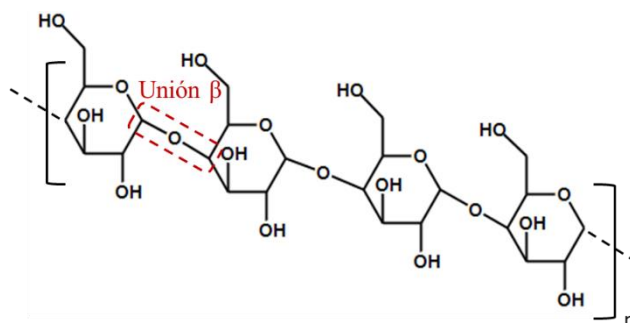


Figura 3: Estructura química de la celulosa.

La celulosa es una larga cadena polimérica de peso molecular variable, con fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$. Tiene una estructura lineal o fibrosa, en la que se establecen múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de distintas cadenas adyacentes de glucosa, haciéndolas impenetrables al agua y originando fibras compactas que constituyen la pared celular de las células vegetales. (Klemm *et al.*, 2005)

La hemicelulosa es un polisacárido compuesto por un conjunto heterogéneo de polisacáridos a su vez formados, cada uno, por un sólo tipo de monosacárido (glucosa, galactosa o manosa entre otros) unidos por enlaces α -(1-4)-glucosídicos (fundamentalmente xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, glucosa y ácido glucurónico) que forman una cadena principal con puntos específicos de ramificación (Ver Figura 4). Forma parte de las paredes de las células vegetales, recubriendo la superficie de las fibras de celulosa. (Yang *et al.*, 2007)

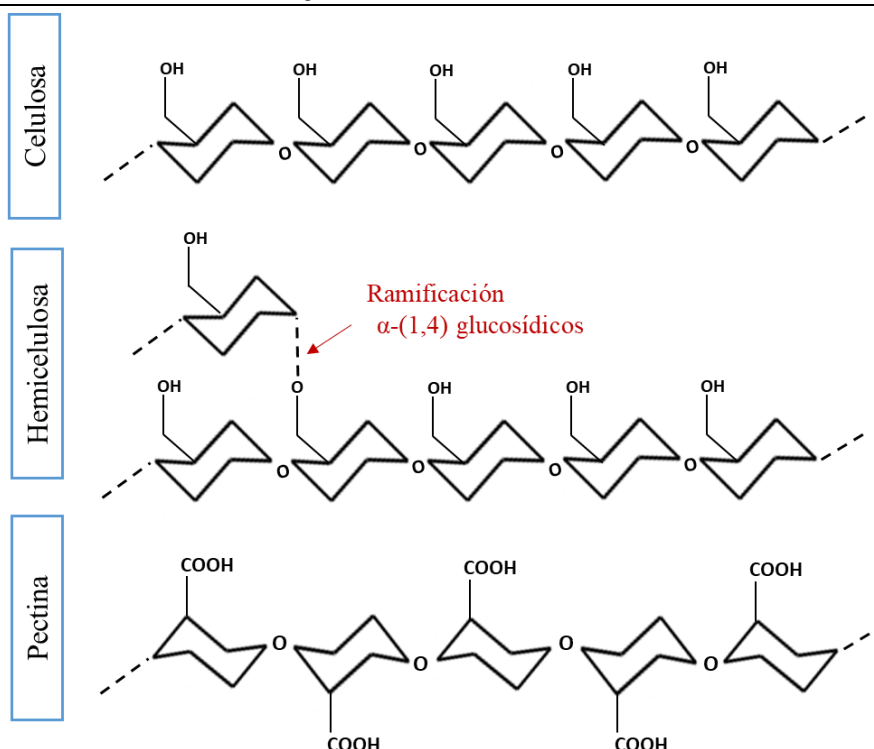


Figura 4: Estructuras químicas de celulosa, hemicelulosa y pectina.

La palabra lignina proviene del término latino *lignum*, que significa “madera”. La lignina es una clase de polímeros orgánicos complejos, fenólicos y reticulados que forman materiales estructurales importantes en los tejidos de soporte de plantas vasculares y de algunas algas. (Yang *et al.*, 2007)

Las pectinas son un tipo de heteropolisacáridos. Una mezcla de polímeros ácidos y neutros muy ramificados. Son el principal componente de la lámina media de la pared celular. En presencia de agua forman geles. (Mohnen, 2008)

2.5. Proceso de Producción de Bioetanol

La producción de bioetanol a partir de fuentes amiláceas involucra las etapas de pretratamiento, licuefacción y sacarificación del polisacárido (hidrólisis enzimática) con la posterior fermentación de los azúcares más simples por parte de levaduras. (Nikolić *et al.*, 2009) La Figura 5 muestra un diagrama donde se resume la operaciones, que se describirán detalladamente a continuación.

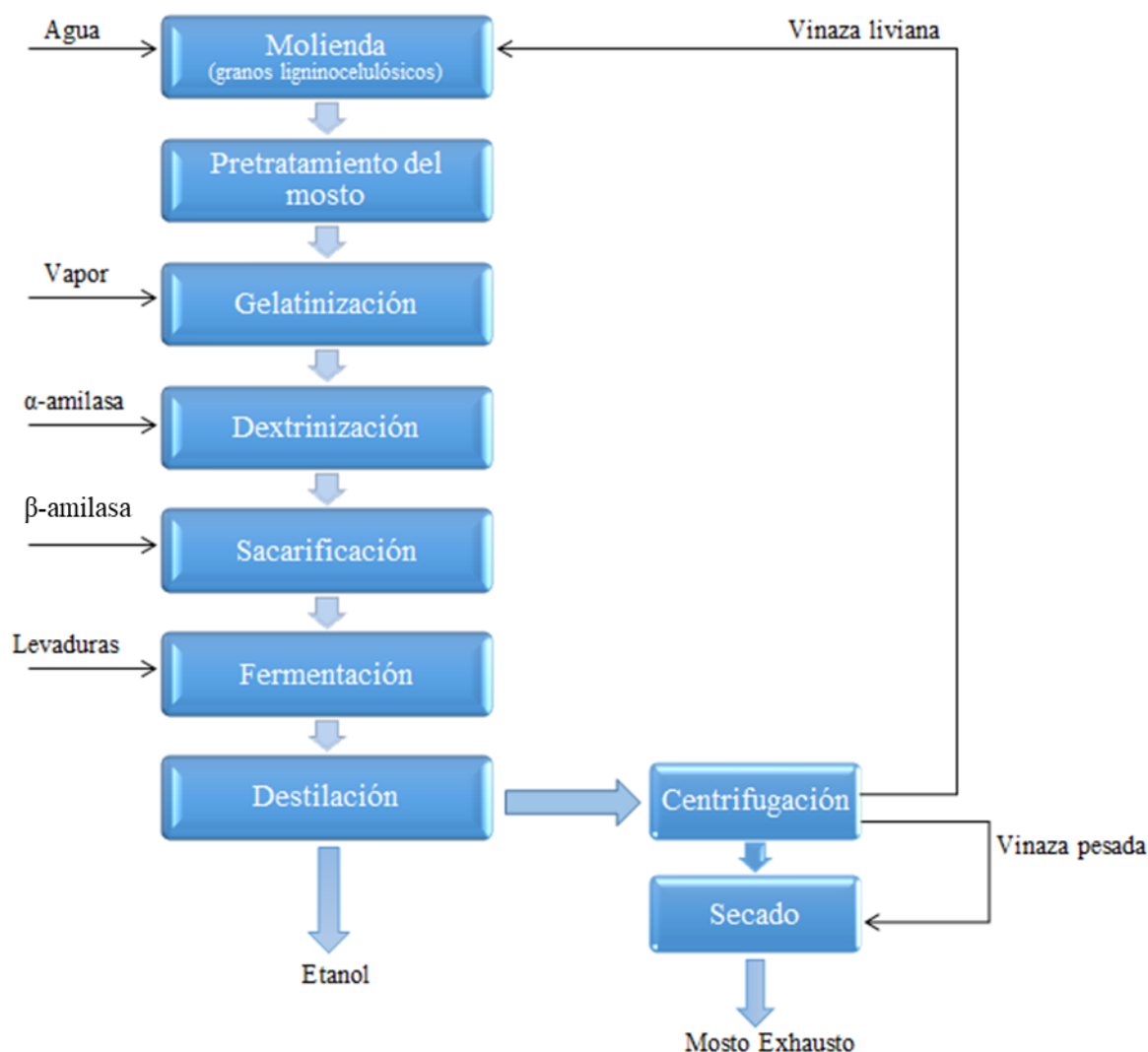


Figura 5: Diagrama de bloques del proceso de producción de bioetanol.

2.5.1. Pretratamiento de la Materia Prima

La primera y segunda generación de combustibles del etanol vía fermentación microbológica se producen a partir de una gran variedad de materias primas vegetales que contienen gran cantidad y diversidad de carbohidratos. Es por eso que, el proceso de la primera etapa depende de la materia prima involucrada. Principalmente, el objetivo del

pretratamiento es aumentar la accesibilidad enzimática a reactivos mejorando la digestibilidad de estos carbohidratos. (Menon y Rao, 2012) Como primera etapa del pretratamiento, los granos rotos y materiales extraños (por ejemplo, virutas, suciedad, arcilla, mazorcas) se filtran usando procedimientos mecánicos. En la segunda etapa, los granos limpios se trituran en molinos de martillos para lograr partículas granulares de tamaño uniforme entre 0,5 y 2 mm de diámetro. La etapa de pretratamiento crece en complejidad de la primera a la tercera generación de biocombustibles debido a las barreras físicas y químicas que representa la hidrolización de pectina, lignina, celulosa y hemicelulosa en azúcares fermentables. (Binod *et al.*, 2010; Balat, 2011) Por lo tanto, se deben seleccionar métodos de pretratamiento específicos con condiciones definidas de acuerdo con el proceso para las siguientes etapas de hidrólisis y fermentación.

2.5.2. Reacciones de Licuefacción y Sacarificación

Antes de la fermentación, los azúcares simples deberían estar disponibles en el medio de reacción para ser metabolizados por las levaduras. El almidón en su forma natural, no es asimilable por las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, por lo que una serie de enzimas deben transformarlo en sacáridos más simples. (Bulón *et al.*, 1998) Para lograr esto, industrialmente se usan enzimas de α y β -amilasas. El objetivo de la enzima α -amilasa es que los carbohidratos de almidón se fragmenten produciendo dextrinas lineales de cadenas carbonadas cortas. Luego, la mezcla resultante se sacarifica con β -amilasa para desdoblar esas dextrinas en glucosa, tal y como se indica en la Figura 6.

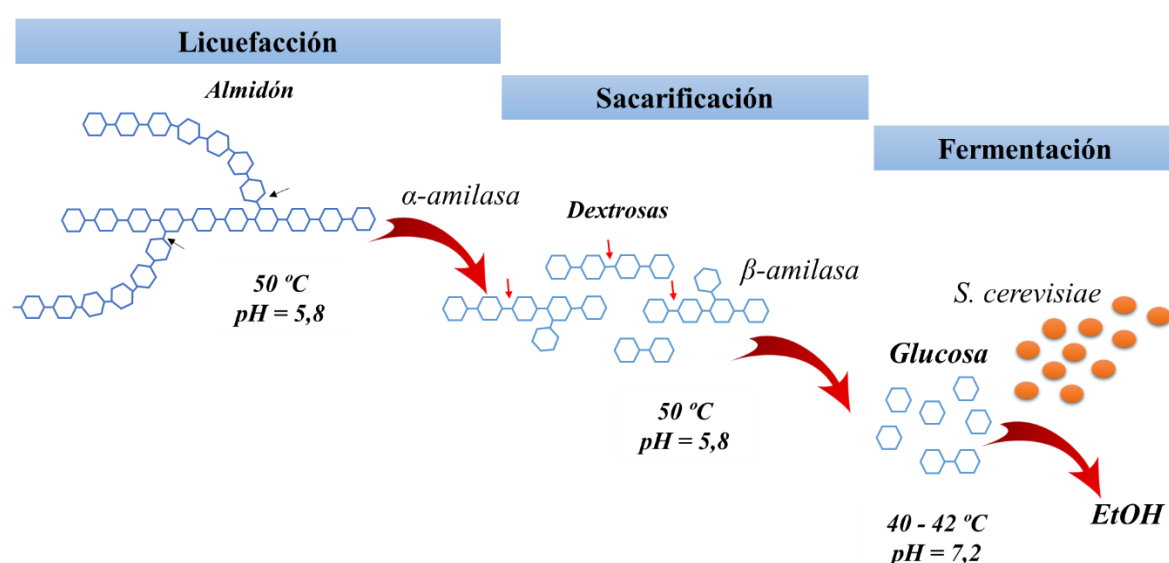


Figura 6: Producción de bioetanol etapas de licuefacción, sacarificación y fermentación.

Durante la etapa de hidrólisis o licuefacción, a una mezcla semilíquida de partículas finas comúnmente llamada lechada, conteniendo una proporción agua/mosto de 1:3. se le incorporan enzima α -amilasa para conformar fragmentos solubles en agua más pequeños, con cadena de longitud variable, denominadas dextrinas. Para ajustar el pH a 5,5 - 5,8 se añaden amoníaco (fuente de nitrógeno) y óxido de calcio. Con el fin de evitar el crecimiento microbiano, antes de la etapa de licuefacción, la suspensión se calienta brevemente hasta 80 °C mediante un *jet-cooker* (cocción por chorro) o un sistema similar de inyección de vapor de agua. (Binod *et al.*, 2011)

Posteriormente, se añade una enzima termoestable diferente llamada β -amilasa para fragmentar las dextrinas en glucosa y otros azúcares simples fermentables. Para mantener los catalizadores enzimáticos en las condiciones óptimas del proceso, la suspensión se calefacciona a 50 °C durante 5-6 h y se usa ácido sulfúrico o un ácido inorgánico similar para mantener la suspensión a un pH de 5,8. Usualmente, la salida aguas arriba se mezcla con una fracción de agua reciclada de la destilación de etanol para reducir la viscosidad de la suspensión, el agua contenida constituye aproximadamente el 15 % del volumen final de líquido. Después, la suspensión se enfría a 42 °C para comenzar la fermentación. (Alvira *et al.*, 2010)

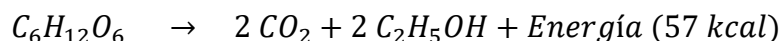
2.5.3. Fermentación

La etapa de fermentación es un proceso biológico que consiste en la conversión de monosacáridos simples en etanol por la acción de levaduras, en condiciones anaeróbicas. El principal objetivo de la reacción de fermentación es lograr el máximo rendimiento de etanol a una velocidad de fermentación rápida y con una baja acumulación de subproductos. (Liu, Wang y Ou-Yang, 2009) En consecuencia, las especies de levadura requeridas en el proceso de fermentación deben tener habilidades especiales que permitan altos estándares de productividad y calidad. Además, son deseables alta viabilidad celular y estabilidad genética bajo condiciones de estrés. (Basso *et al.*, 2008) Suelen utilizarse especies muy productivas, como *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum* y *Candida utilis*. (Postma *et al.*, 1989; Babrzadeh *et al.*, 2012) También se han utilizado las especies *Saccharomyces anamnesis* y *Schizo saccharomyces pombe*. (Carrillo *et al.*, 2007)

La fermentación produce etanol, CO₂ y calor. Por la estequiometría de la reacción (Reacción 1) se deduce que por cada molécula de glucosa se producen dos moléculas de etanol y dos moléculas de CO₂. Por lo tanto, y considerando que no se genera ningún otro

subproducto o biomasa, 1 kg de glucosa será capaz de producir como máximo 0,51 kg de etanol y 0,49 kg de CO₂.

Reacción 1: Reacción de fermentación de glucosa



En la etapa de fermentación, las levaduras, pre-cultivadas en tanques de cultivo, se añaden a la mezcla para fermentar la glucosa a etanol. Otros componentes del mosto, principalmente proteínas y aceites, permanecen sin cambios durante el proceso de fermentación. Después de 80-90 h de operación, el mosto exhausto en almidón se separa en una fracción de etanol y vinaza pesada. Posteriormente, el etanol se concentra por una columna de destilación fraccionada y se deshidrata. El etanol anhidro se mezcla con un agente desnaturalizante y está listo para su envío al mercado de combustibles. El mosto residual, conteniendo aún biomasa susceptible de ser hidrolizada, rico en enzimas y levaduras exhaustas se vende a industrias agroalimentarias. (Cardona y Orrego, 2009; Amorim *et al.*, 2011)

2.5.4. Destilación

Después del proceso de fermentación, se necesita un proceso corriente arriba para obtener etanol de alta pureza. La fermentación con etanol alcanza su rendimiento máximo de aproximadamente 10 % p/p (14,5 % v/v). La destilación es el proceso más utilizado para enriquecer la fracción de etanol. La destilación alcanza típicamente un rendimiento del 95,6 % v/v. La razón límite es el punto azeotrópico de la mezcla agua-etanol, que consiste en 95,6 % de etanol y 4,4 % de agua en volumen. Si una pureza de etanol superior es deseable, la eliminación del agua de la mezcla azeotrópica se hará utilizando solvente terciario, tamices moleculares, bajo destilación al vacío u otro método adicional. (Grayson, 2011)

2.6. Conceptos Básicos

2.6.1. Inmovilización de Células y/o Enzimas para la Producción de Bioetanol

En el proceso de bioetanol tradicional tanto enzimas como levaduras, son adicionadas a la mezcla de reacción donde permanecen suspendidas libremente. La etapa de biosíntesis de

etanol es determinante en el rendimiento final del proceso, para lo cual es necesario el eficiente desdoblamiento del almidón a través del tren enzimático α , β -amilasas. La mayoría de las enzimas son muy sensibles a las condiciones de trabajo y para obtener buenos rendimientos de producción las cantidades recomendadas deben sobreespecificarse. (Bajpai, 2013) Por otra parte, al ser solubles en agua, la separación de enzimas, reactivos y productos se torna dificultosa y, por lo tanto, no es posible su reutilización. (Ariyajaroenwong *et al.*, 2012) La implementación de enzimas inmovilizadas podría permitir superar estos inconvenientes, permitiendo que el proceso biotecnológico sea económicamente más rentable. Adicionalmente, el empleo de levaduras inmovilizadas para la fermentación alcohólica es una técnica interesante, ya que ofrece un amplio panorama de mejoras al sistema de producción. (Mulko, L., *et al.*, 2017)

Enzimas y levaduras inmovilizadas tienen aplicación potencial en la producción de biocombustibles impartiendo múltiples ventajas: la posibilidad de recuperar y reutilizar células y levaduras mediante un sistema de filtración simple y económico, la creación de una barrera de protección física frente a condiciones medioambientales adversas (pH, temperatura, sales, disolventes, inhibidores, etc.) y el consecuente aumento de la estabilidad de enzimática, ya que la matriz actúa como medio protector. (Brady y Jordaan, 2009; Rodrigues *et al.*, 2013; Mulko *et al.*, 2016)

La inmovilización, permite trabajar en condiciones más controladas manteniendo una población microbiana constante y elevada, lo que a su vez permite altas tasas de dilución y flujos altos, reduciendo así, el tiempo de fermentación. La ausencia de problemas difusionales, resulta otra clara ventaja, ya que la permeabilidad de las matrices permite la difusión de compuestos de bajo peso molecular sin pérdida (o con pérdida moderada) del componente activo. (Nikolić *et al.*, 2010)

Como ventajas adicionales del proceso de inmovilización, puede mencionarse la utilización de poblaciones microbianas más densas, sin riesgo de alteración de las propiedades reológicas del medio, la disminución de problemas de retromezclado y transferencia de calor, ya que los microorganismos están unidos a un soporte sólido constituyendo un sistema heterogéneo y no una emulsión como en el caso de las células libres. También, resulta interesante mencionar que la inmovilización, indirectamente, actúa favoreciendo la simplificación de pasos posteriores del bioproceso, en particular, el acondicionamiento del mosto residual. (Acevedo *et al.*, 2017)

Por otro lado, el sistema de inmovilización admite gran versatilidad operativa posibilitando diversas configuraciones de reactores y sistemas de cultivos optimizando, de esta forma, rendimientos de producción e incrementando la productividad volumétrica. (Cristina y Astudillo, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Ariyajaroenwong *et al.*, 2016) Así, el proceso de hidrólisis-fermentación empleando sistemas inmovilizados podría ser económicamente más rentable en comparación con el proceso tradicional, ofreciendo mayores rendimientos y un menor empleo de recursos.

En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios de investigación en diversas áreas (ingeniería de materiales, microbiología, re-ingeniería), enfocados en optimizar, desde diferentes lineamientos, el rendimiento global del proceso. (Hernández Nodarse, 2007; Ylivero, *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012; Mulko *et al.*, 2017) En estos estudios, los puntos claves a perfeccionar se relacionan con las tres etapas principales del proceso: licuefacción, sacarificación y fermentación.

La optimización de la forma operativa del proceso plantea la substitución de la clásica operación batch por una configuración continua (Fan *et al.*, 2015) o semi-continua (Zhang *et al.*, 2010), en la cual el sustrato se añade al reactor en forma continua o secuencial y el producto egresa del mismo en forma continua, operando según la estrategia adecuada. Las ventajas de un sistema de producción continua se relacionan con la posibilidad de producción de bioetanol a gran escala, con el manejo y homogeneización del medio, la reducción de volúmenes muertos y *by-pass* de flujo, la disminución global del tamaño de la planta de producción y la optimización del consumo de enzimas y levaduras de alto costo comercial, entre otras. (Phukoetphim *et al.*, 2017)

El sistema de operación continua es uno de los métodos más utilizados en industrias de gran amplitud para producción de etanol debido a que las productividades son mayores, el tiempo de fermentación es menor y se consiguen elevadas velocidades de licuefacción/sacarificación. Otros estudios concernientes a la optimización operativa del proceso, formulan la posibilidad de realizar simultáneamente los procesos de licuefacción-sacarificación-fermentación constituyendo los denominados procesos *one-pot*, logrando un compromiso entre eficiencia, costos y producción. (Nikolić *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2012)

En cuanto a los microorganismos encargados de la fermentación, las alternativas en estudio surgen de la manipulación genética de levaduras, creando cepas más resistentes a condiciones de estrés orgánico. Además, surgen alternativas como procesos de co-

fermentación, que consiste en la adición de dos especies de levaduras al medio, para incrementar los rendimientos fermentativos. (Gallego Gil, 2007; Chen, 2011; Gupta *et al.*, 2014)

2.6.2. Perspectiva Histórica de Hidrogeles y sus Derivados

El término "*hidrogel*" apareció por primera vez en informes científicos en 1894 cuando se usó para hacer referencia a un gel coloidal basado en sales inorgánicas. En 1960, Wichterle y Lim reportaron el primer trabajo sobre hidrogeles de poli (2-hidroxietil metacrilato) (pHEMA) para ser utilizados como lentes de contacto blandas. (Wichterle y Lím, 1960) En la década de 1970 aparecieron los hidrogeles Pluronic® para la liberación controlada de varios agentes farmacéuticos. (Müller *et al.*, 2015) La investigación de Lin y Sun en 1980 mostró la aplicación exitosa de microcápsulas de alginato de calcio para la encapsulación celular. (Lim y Sun, 1980) Además, en la década de los '80, se modificaron los hidrogeles para otras aplicaciones tales como materiales de lentes de contacto o como posibles matrices para liberación controlada de fármacos. (Harris *et al.*, 1980; Graham y McNeill, 1984) En 1989, Bae *et al* describieron el proceso sintético y la sensibilidad térmica de un hidrogel e investigaron los efectos de la temperatura sobre las tasas de permeación de la insulina. (Bae *et al.*, 1989) Posteriormente, Brøndsted y Kopeček describieron la síntesis de diferentes tipos de hidrogeles a base de metacrilamidas N-sustituidas hidrofílicas, N-terc-butilacrilamida y ácido acrílico reticuladas con metacrilamidas y demostraron que tienen un gran potencial para liberación específica de fármacos. (Brøndsted y Kopeček, 1991)

Investigaciones anteriores mostraron que los hidrogeles podrían utilizarse en diversos campos de investigación tales como los biomateriales. (Burczak *et al.*, 1996; Kang *et al.*, 1999; Miyazaki *et al.*, 2000) Por otra parte, un gran número de autores han informado que los hidrogeles muestran propiedades interesantes que los hacen excelentes candidatos como materiales biocompatibles. (Kwon *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 2013) Actualmente, la utilización de hidrogeles ya no queda recluida sólo a la liberación controlada de fármacos, sino que se ha extendido exponencialmente a múltiples áreas tales como la producción de biocombustibles (Mulko *et al.*, 2017), la purificación y el tratamiento de aguas contaminadas (Tang *et al.*, 2010), inmovilización enzimática y celular en diversas

reacciones catalíticas(Xu *et al.*, 2013) y bioingeniería de tejidos(Ashton *et al.*, 2007), entre otros.

2.6.3. Técnicas de Inmovilización

En el área de ingeniería de materiales, la inmovilización de levaduras y enzimas en distintos soportes orgánicos e inorgánicos ha cobrado protagonismo recientemente. (Tischer y Wedekind, 1999; Zhaoxin *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2009; Buthe, 2011) De esta forma, las células pueden permanecer libres en el medio o estar inmovilizadas en matrices, generalmente poliméricas, lo que aumenta la eficiencia del proceso y la vida útil de los mismos; brindándoles protección a condiciones medioambientales adversas, sin comprometer la integridad de levaduras y enzimas, ya que estos procesos implican una alteración mínima de su estructura química. (Ateş y Mehmetoğlu, 1997)(Krajewska, 2004)

Recientes descubrimientos en nanotecnología y ciencia de los materiales han logrado proporcionar una gran cantidad de materiales que podrían ser potencialmente utilizados en la inmovilización de enzimas y levaduras. (Shoichet, 2010; Laftah, Hashim y Ibrahim, 2011; Rodrigues *et al.*, 2013) De esta forma, la inmovilización o entrapamiento celular encuentra cada vez mayor número de aplicaciones en una amplia variedad de campos, tales como medicina y sistemas de liberación controlada de drogas, biosensores y diagnósticos clínicos, catálisis en productos farmacéuticos, productos derivados de la industria química y cosmética, productos agrícolas como herbicidas y plaguicidas, industria vitivinícola y de bebidas alcohólicas, producción de biocombustibles de primera y segunda generación y compuestos químicos derivados de alto valor agregado. (Krajewska, 2004)

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que, en el mejor de los casos, pueden ser utilizadas repetidamente. (Meyer, 2007) El concepto de inmovilización se fundamenta en la incorporación de una matriz polimérica a un compuesto químico de interés, la cual genera un ambiente propicio capaz de controlar su interacción con el exterior. Además, la inmovilización de células o microorganismos involucra procesos sencillos y reproducibles que no requieren equipos sofisticados. (Rodríguez *et al.*, 2013)

Krajewska describe en forma general a la técnica de inmovilización como un “empaquetado” de materiales sólidos, líquidos o gaseosos mediante cápsulas o pastillas que

liberan su contenido de forma controlada bajo determinadas condiciones externas. (Krajewska, 2004) Estas especificaciones han llevado a describir esta técnica como una barrera retardadora de reacciones químicas con el medio externo circundante; promoviendo de esta forma un aumento en la vida útil del producto, induciendo la liberación gradual del compuesto inmovilizado e incluso facilitando su manipulación, al transformar un material líquido o gaseoso a un composite sólido o semisólido. (Homaei *et al.*, 2013)

El componente que se incorpora al composite suele denominarse fase interna o principio activo, mientras que la membrana o soporte suele nombrarse capa externa o matriz. El principio activo puede encontrarse rodeado, entrecruzado o disperso uniforme o heterogéneamente en forma de partículas en la matriz. Los composites pueden tener forma esférica, cilíndrica o irregular. Asimismo, pueden estar constituidos por una membrana simple, múltiples capas e incluso núcleos múltiples cuya matriz puede ser del mismo material o una combinación de varios materiales. (Illanes, 2008)

Existe una gran variedad de técnicas de inmovilización de sustratos activos, pero a los fines de nuestro estudio, se mencionarán estos tres métodos bien diferenciados (Mulko, L., *et al.*, 2017) (Figura 7):

- Encapsulación
- Inmovilización por atrapamiento
- Inmovilización por adsorción

2.6.3.1. Encapsulación

Las enzimas se encapsulan u ocuyen dentro de una cápsula que consiste en una membrana permeable que permite el paso de los sustratos y de los productos, pero conserva la enzima dentro de la misma. (Xu *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014) El principio activo puede encontrarse rodeado o disperso uniforme o heterogéneamente en forma de partículas o moléculas en el núcleo o fase interna de la cápsula. Las cápsulas pueden tener forma esférica, cilíndrica o irregular. Asimismo, pueden estar constituidas por una membrana simple, múltiples capas e incluso núcleos múltiples cuya matriz puede ser del mismo material o una combinación de varios materiales. (Krajewska, 2004; Silva *et al.*, 2014) La inmovilización mediante encapsulación es una técnica simple, económica, de condiciones químicas suaves. Posee una alta tasa de inmovilización (relación componente activo/volumen matriz). Su principal contrapartida es la capacidad para retener eficientemente el compuesto activo dentro de la cápsula permeable, especialmente en el caso de moléculas pequeñas.

2.6.3.2. Atrapamiento

Los biocatalizadores también pueden inmovilizarse mediante atrapamiento formando un composite constituido por una red tridimensional porosa entre la cual se encuentra disperso e inmovilizado el componente activo. (Öztop *et al.*, 2003; Hoare y Kohane, 2008) Esta red entrecruzada se obtiene utilizando agentes de reticulación o *cross-linkers*, el más conocido de ellos es el glutaraldehído. Este método permite retener el compuesto de forma más eficiente, principalmente en el caso de inmovilización enzimática. Su principal desventaja es la limitación por transferencia de masa y una posible desactivación del compuesto activo durante la inmovilización, para el caso de reacciones químicas que requieran condiciones agresivas para el compuesto de interés. (Mulko *et al.*, 2016) Los hidrogeles poliméricos utilizan esta ruta de inmovilización.

2.6.3.3. Adsorción

Los materiales utilizados en la adsorción son de los más diversos, desde sustratos porosos clásicos como carbón activado, alúmina y resinas de intercambio iónico, hidrogeles y materiales poliméricos hasta granos de arroz o cáscaras de frutas. (Konwarh *et al.*, 2009; Homaei *et al.*, 2013) Este método es barato, simple y reversible. Sus principales desventajas son una fuerza de unión débil entre matriz-componente activo y su baja tasa de inmovilización. No es factible inmovilizar células ni moléculas de gran tamaño mediante esta técnica.

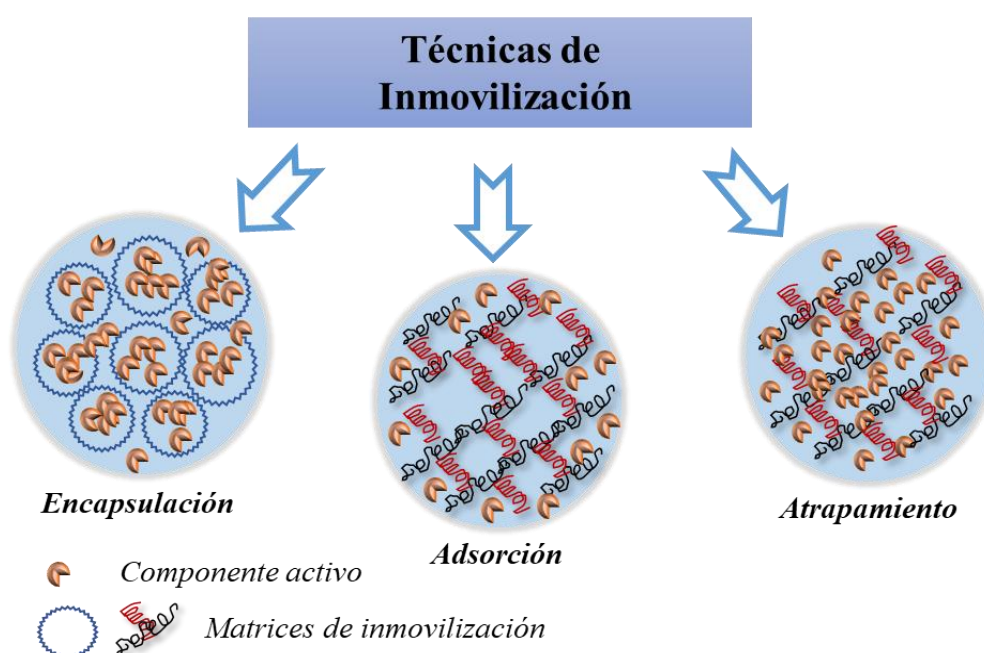


Figura 7: Técnicas de inmovilización enzimática y celular más importantes. (Mulko *et al.*, 2017)

Históricamente los hidrocoloides, particularmente hidrogeles y alginatos, han sido los polímeros elegidos a la hora de realizar inmovilización, debido a su gran capacidad para absorber agua, fácil manipulación e inocuidad, así como por poseer propiedades gelificantes y estabilizantes; generando una matriz soporte altamente versátil, biocompatible y no tóxica para la protección de los componentes activos, células o microorganismos sensibles al calor, pH, oxígeno y luz, entre otros factores, a los que son expuestos estos durante su procesamiento. (Andrés Illanes, 2008; Silva *et al.*, 2014)

2.7. Síntesis de Matrices de Inmovilización de Enzimas y Levaduras

2.7.1. Hidrogeles Poliméricos Basados en Acrilamida

Los hidrogeles son polímeros orgánicos entrecruzados de estructura tridimensional que se caracterizan por su alta capacidad de absorción de agua o solución acuosa. Los hidrogeles proceden de monómeros vinílicos de acrilamida y/o sus derivados. (Laftah *et al.*, 2011) Dependiendo de su composición química, se trata de materiales hidrofílicos, insolubles en agua, blandos, elásticos y que poseen gran capacidad de hinchamiento o *swelling* en agua, aumentando considerablemente su volumen, pero manteniendo su forma, hasta alcanzar un equilibrio físico-químico; mientras que en estado deshidratado (xerogel) su estructura posee cierto grado de cristalinidad. Los hidrogeles son sistemas en estado coloidal con apariencia sólida, es decir, físicamente son especies intermedias entre el estado sólido y el estado líquido, ya que la naturaleza de un hidrogel hinchado tiene simultáneamente las propiedades cohesivas de los sólidos y las propiedades difusivas de transporte de los líquidos. (Chu *et al.*, 2013)

Las características particulares de los hidrogeles son consecuencia de múltiples factores, entre ellos, cabe destacar la presencia de grupos funcionales hidrofílicos (como OH, COOH, CONH₂, CONH, SO₃H) en su estructura molecular. Las fuerzas cohesivas que producen el entrecruzamiento del polímero no son sólo de carácter covalente; también intervienen otras fuerzas intermoleculares, como electrostáticas, interacciones dipolo-dipolo o enlaces de hidrógeno. (Ping *et al.*, 2001)

Los hidrogeles que absorben volúmenes de agua superiores al 500 % y de hasta el 10000 % se conocen como “*superabsorbentes*”. Dichos geles contienen grupos cargados que mejoran la interacción con el agua. Se ha comprobado que tanto el grado como naturaleza del entrecruzamiento, la tacticidad y la cristalinidad del polímero, son los responsables de las

características físicoquímicas y mecánicas que aparecen en el hinchamiento del hidrogel. (Caykara *et al.*, 2006)(Molina, 2011)

Existe una variedad particular de hidrogeles conocidos como "hidrogeles inteligentes". Estos son materiales sensibles a un estímulo externo físico o químico experimentado, como respuesta a este estímulo, una transición de fase de volumen o forma (Figura 8). Dentro de los estímulos físicos se incluye la temperatura, el campo eléctrico y magnético, la composición del solvente, la luz y la presión entre otros; mientras que los estímulos químicos o bioquímicos son el pH y la fuerza iónica, entre otros. (Chu *et al.*, 2013)

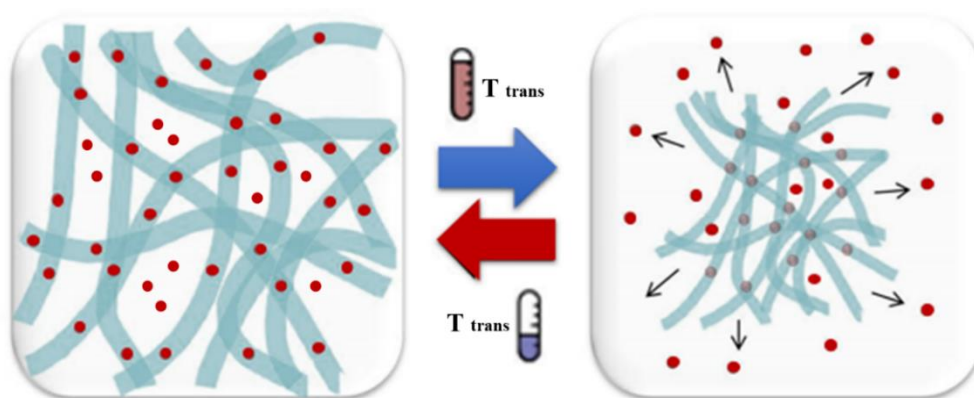


Figura 8: Transición de fase de un hidrogel frente a un cambio en la temperatura. (Smart hydrogels, 2013)

2.7.2. Preparación de Hidrogeles: Polimerización Radicalaria

La síntesis de un hidrogel es un proceso de polimerización radicalaria con una serie de peculiaridades que otorgan características específicas de estos materiales. Además del disolvente, monómero y sistema de iniciación, se introduce al sistema de reacción: el agente entrecruzante o *cross-linker*. El esquema de la polimerización radicalaria que da lugar a la síntesis de hidrogeles, en términos generales, se muestra en la Figura 9. Agua o soluciones acuosas diluidas serán el medio disolvente habitual de síntesis. (Kricheldorf *et al.*, 2004; JagadeeshBabu *et al.*, 2011)

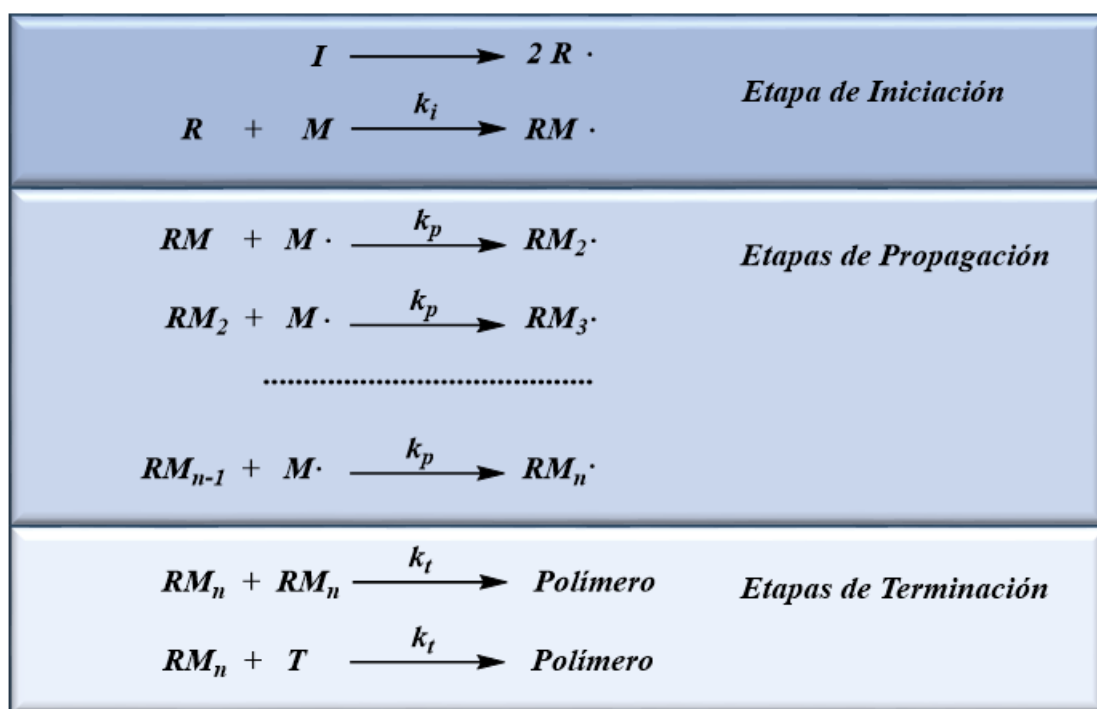


Figura 9: Etapas de polimerización radicalaria para monómero e iniciadores genéricos (Molina, 2011).

La etapa de iniciación, normalmente, se desdobra en dos reacciones: en primer lugar, una molécula llamada iniciador (I_2) da lugar a radicales libres ($I \cdot$) por diferentes mecanismos, siendo el más común el de disociación homolítica que genera dos especies radicales. Los radicales se forman aportando al sistema energía térmica, fotoquímica o potencial redox. En la segunda reacción de iniciación, el radical se adiciona a una molécula de monómero vinílico para dar lugar a una especie activa radicalaria que ya contiene una unidad monomérica. Esta especie activa, verdadero iniciador de la reacción en cadena, actúa reaccionando con más moléculas de monómero durante la etapa de propagación, ocasionando un crecimiento de la cadena. (Molina, 2011)

Finalmente se encuentran y reaccionan dos radicales y se detiene la propagación y el crecimiento de las cadenas, produciéndose la terminación de la reacción. Los radicales pueden ser cadenas en crecimiento o radicales del iniciador. Ésta se puede dar por reacciones de combinación, desproporciónación o ambas.

Las reacciones de transferencia de cadena también suspenden el proceso de reacción de adición en cadena, dando lugar a cadenas inertes de polímero. En este caso, el radical en crecimiento sufre una desactivación prematura mediante un proceso de transferencia de un

átomo, generalmente un protón, de una molécula presente en el medio de reacción. A esta molécula se la llama agente de transferencia, y puede ser el propio monómero, el iniciador, el polímero o el disolvente de la reacción. Las reacciones de transferencia disminuyen el largo de cadena sin cambiar la velocidad de reacción.

2.7.2.1. Monómeros

- Acrilamida (AAm): polímero modelo. No sensible a pH ni temperatura
- Ácido Acrílico (AA): hidrogel pH-sensible $pH_{trans.} = 5-5,6$
- N-isopropilacrilamida (NIPAM). Hidrogel termosensible $LCST = 32,5^{\circ}C$
- Ácido 2-acrilamidopropansulfónico (AMPS): hidrogel aniónico superabsorbente
- N-[tris(hidroximetil)metil]acrilamida (HMA): hidrogel superabsorbente, eléctricamente neutro.

En la Figura 10, presentada a continuación, se muestran las estructuras químicas de los respectivos monómeros.

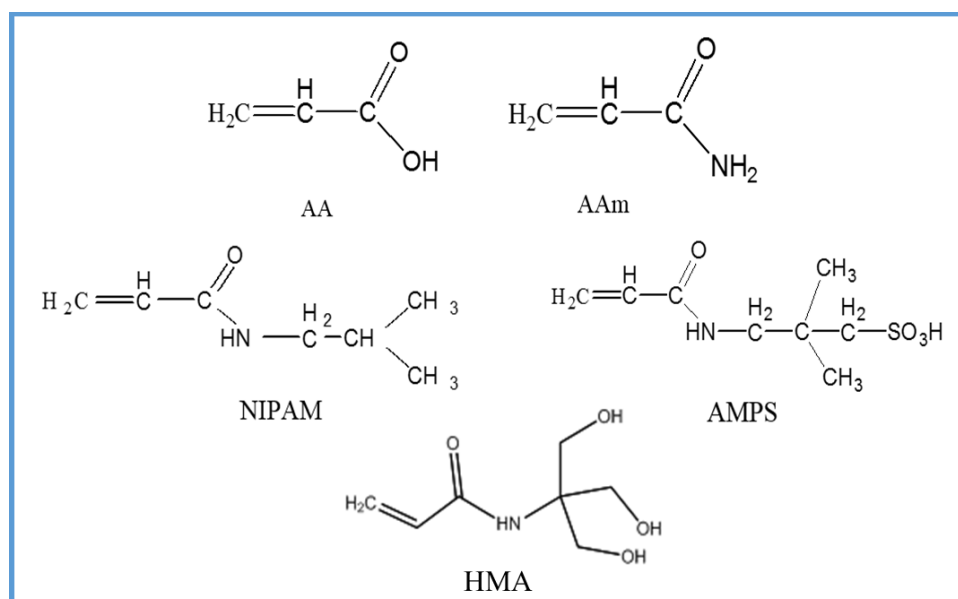


Figura 10: Estructura química de monómeros y co-monómeros vinílicos.

2.7.2.2. Iniciadores

Independientemente del tipo de polimerización y de los monómeros que se utilicen, es necesario emplear un agente desencadenante de la reacción de polimerización o iniciador. Los

sistemas de iniciación que pueden emplearse son los habituales en la síntesis de polímeros. Para la iniciación redox se utiliza como agente iniciador Persulfato de Sodio (APS, Cicarelli) y el activante N,N,N',N'-tetrametiletilenediamino (TEMED). El TEMED acelera una ruptura homolítica en el peroxidisulfato de amonio (APS) en medio acuoso, generando el radical iniciador. La Figura 11 presenta las estructuras químicas del oxidante y el activante del sistema iniciador y en la Figura 12 se muestra la generación del radical iniciador. Por último, la Figura 13 el mecanismo de iniciación.

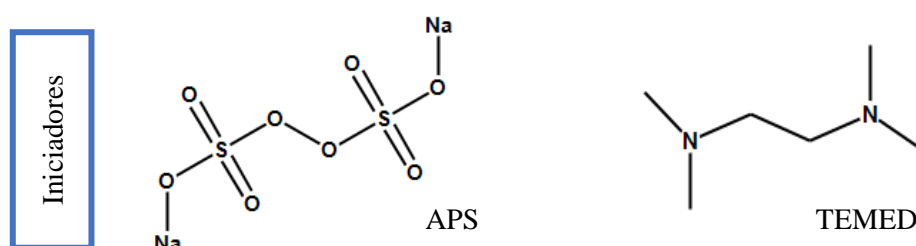


Figura 11: Estructuras químicas del sistema iniciador de la polimerización.

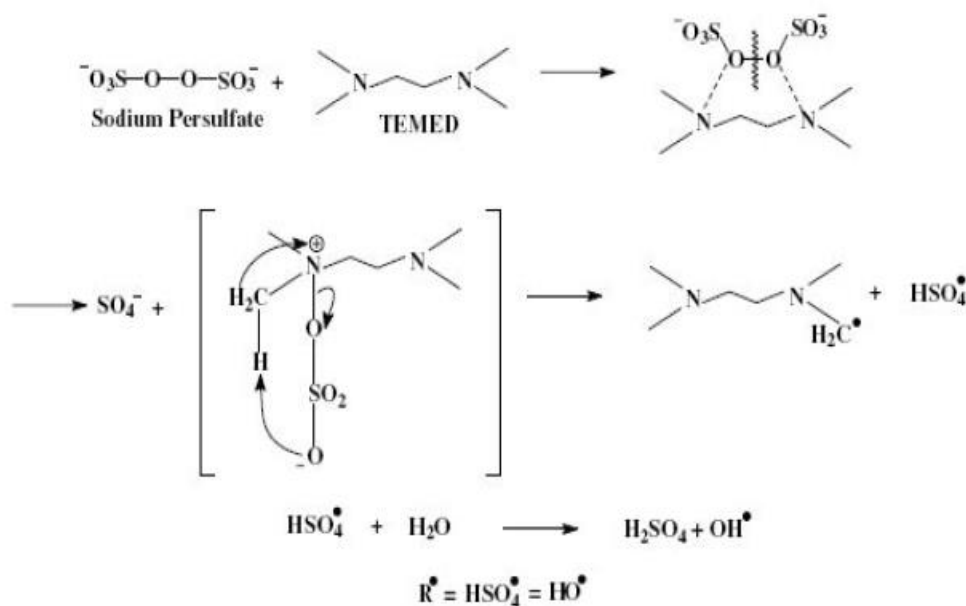


Figura 12: Formación del radical redox.

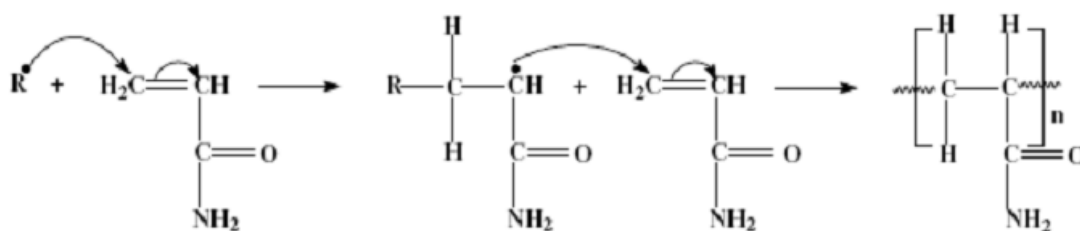


Figura 13: Mecanismo de iniciación del polímero a partir de un monómero vínilico.

2.7.2.3. Agente Entrecruzante

En la síntesis de hidrogeles, la elección del agente entrecruzante o *cross-linker* resulta decisivo a la hora de definir las propiedades del material a sintetizar; ya que es el entrecruzador el formador de la red tridimensional que confiere al gel las características de tal. Dichos entrecruzantes han de poseer de varios grupos reactivos en su estructura molecular, para así poder entretrejer distintas cadenas poliméricas, siendo habituales los tetra- y hexa-funcionales.

Generalmente el agente entrecruzante se utiliza en un porcentaje muy bajo en comparación con la del total de monómero que se utiliza en la reacción de polimerización. Un elevado grado de entrecruzamiento (número de entrecruzamientos que existen por unidad de volumen) genera polímeros frágiles de baja elasticidad, mientras que un bajo grado de entrecruzamiento, permite desplazamientos entre las distintas cadenas poliméricas y conduce a altas elasticidades, pero usualmente bajas a resistencias mecánicas. En el presente tesis, se utiliza como agente de entrecruzamiento: N,N-metilbisacrilamida (BIS). La estructura química del entrecruzador se muestra en la Figura 14.

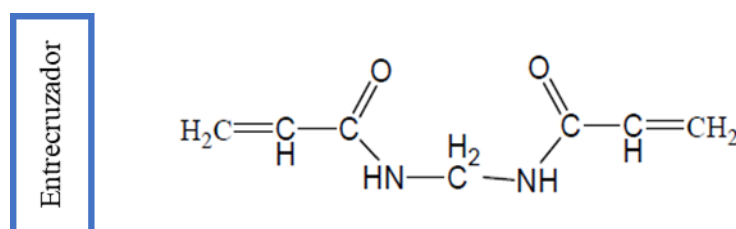


Figura 14: Estructura química del entrecruzador.

2.7.3. Crio-polimerización: Preparación de Hidrogeles Macroporosos

Una buena opción para facilitar la difusión de nutrientes hacia adentro y fuera de la matriz que contiene el componente activo (enzima-levadura) es incorporar cierta porosidad a la matriz. Realizando la polimerización radicalaria por debajo del punto de congelamiento del sistema es posible obtener geles macroporosos. La reacción ocurre en un sistema bifásico, congelado, lo que permite la formación de una morfología bicontinua entre el solvente y el sistema monómero-iniciador. En la Figura 15 se muestra el procedimiento a seguir para obtener hidrogeles macroporosos. (Sun *et al.*, 2014) En primer lugar, se prepara la solución pre-gel, la cual es enfriada hasta el punto de congelamiento, antes de comenzar la polimerización. En el segundo paso se lleva a cabo la cristalización del solvente acuoso,

alrededor de los cuales comienza el proceso de polimerización (Etapa 3). Finalmente, a temperatura ambiente el hielo funde, dando lugar a una estructura macroporosa interconectada.

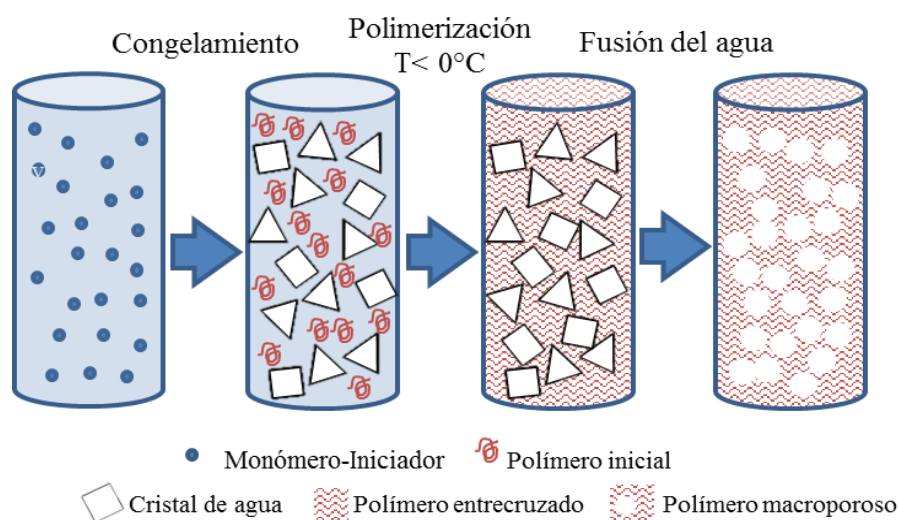


Figura 15: Etapas de crio-polimerización de un hidrogel.

Es fundamental el control de la velocidad de enfriamiento y tiempo de polimerización para lograr reproducibilidad de la porosidad de la matriz. Si el enfriamiento se lleva a cabo hasta una temperatura cerca a la de fusión del solvente acuoso más lentamente tendrá lugar la cristalización, lo que originará cristales más pequeños y consecuentemente menor tamaño de poro. Sin embargo, bajo estas condiciones existe el riesgo de que el líquido mantenga su estado de sobre-enfriamiento y no cristalice de manera alguna. (Molina, 2011)

2.8. Alginato como Matriz de Inmovilización

El alginato es un tipo de polisacárido lineal polivalente e hidrofílico proveniente de las paredes celulares de las algas marinas marrones, en donde se encuentra como sales de calcio, de magnesio y de sodio del ácido algínico. (Valero *et al.*, 2013) Estas algas son conocidas como *Phaeophyceae*, siendo de las más importantes para la producción comercial de los alginatos las *Macrocystis pyryfera*, *Laminaria hyyperborea*, *Laminaria digitata* y *Ascophyllum nodosum*, que son encontradas en el mundo entero.

El ácido algínico (Ver Figura 16) es un polisacárido mezcla compuesta de ácido β -D-manurónico (M) y α -L-gulurónico (G) que se distribuyen en secciones constituyendo homopolímeros o heteropolímeros. El contenido del primero de estos dos monómeros confiere al gel formado mayor o menor grado de rigidez. (Sarker *et al.*, 2015) La sal de calcio de alginato no se disuelve en agua, mientras que la sal de sodio hace.

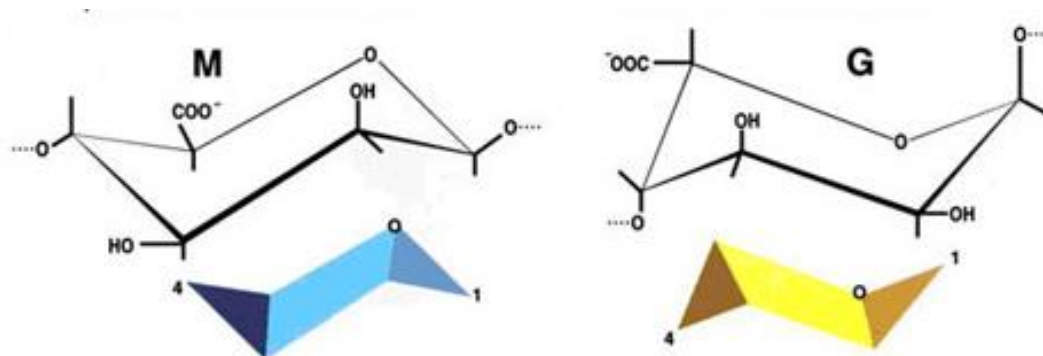


Figura 16: Estructura química de los monómeros del alginato, ácidos β -D-manurónico (M) y α -L-gulurónico (G). (Lee y Mooney, 2012)

La gelificación tiene lugar al producirse una zona de unión entre un G-bloque de una molécula de alginato que se enlaza físicamente a otro G-bloque, contenido en otra molécula de alginato, a través del ion calcio, como se indica en la

Figura 17. Así el grado de gelificación depende de la hidratación del alginato (

Figura 18), la concentración del ion calcio y el contenido de los G-bloques. (Polk *et al.*, 1994)(Kadajji y Betageri, 2011)

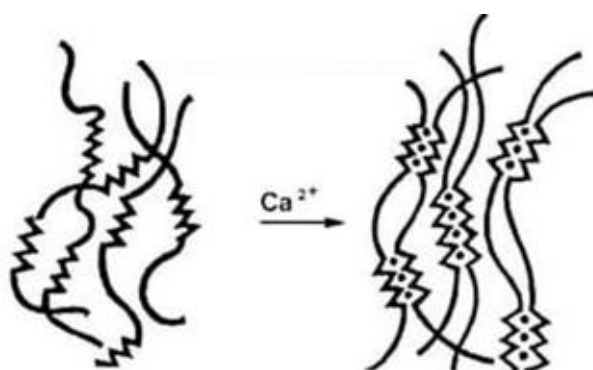


Figura 17: Gelificación de alginato mediante adición de iones calcio. (Sun y Tan, 2013)

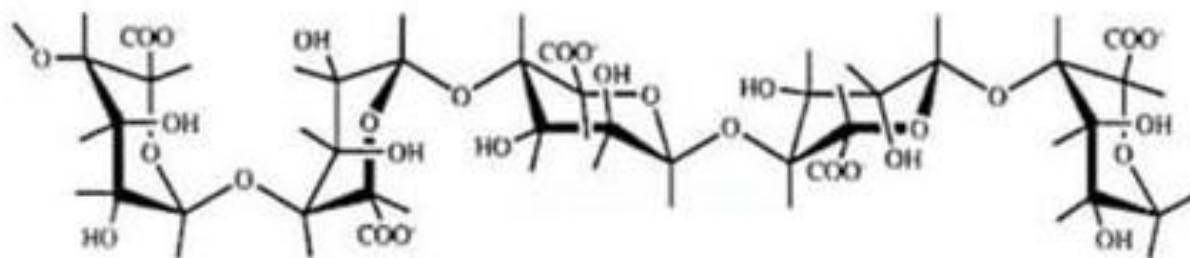


Figura 18: Estructura química del alginato.

3. Inmovilización Enzimática

3.1. Introducción

3.1.1. Las Enzimas

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica y estructural que catalizan reacciones químicas, siempre que éstas sean termodinámicamente factibles. Una enzima hace que una reacción química, que es energéticamente viable pero cinéticamente desfavorable ocurra, razón por la cual, usualmente las enzimas se denominan biocatalizadores o catalizadores biológicos. (Roskoski, 2011) En estas reacciones, las enzimas actúan sobre unas moléculas denominadas sustratos (reactivos), las cuales se convierten en moléculas diferentes denominadas productos. (Vernier, 2006) Como todos los catalizadores, las enzimas funcionan disminuyendo la energía de activación (ΔG^\ddagger) de una reacción y así acelerando la reacción química sustancialmente. Las enzimas no alteran el balance energético de las reacciones en que intervienen, no son consumidas por las reacciones que catalizan, ni alteran su equilibrio químico de la reacción. Las enzimas se diferencian de otros catalizadores por su elevada especificidad y su alta selectividad. (Wilson, 2010)

Al igual que las demás proteínas, la estructura de las enzimas está compuesta de una cadena lineal de aminoácidos que se pliega durante el proceso de transducción para dar lugar a una estructura terciaria tridimensional, susceptible de presentar actividad. Cada secuencia de aminoácidos es única y por tanto da lugar a una estructura con propiedades definidas. En ocasiones, proteínas individuales pueden unirse a otras proteínas para formar complejos, en lo que se denomina estructura cuaternaria de las proteínas. (Illanes, 2008)

A la hora de seleccionar un procedimiento de encapsulación enzimático, se requieren condiciones muy suaves, que no afecten la actividad catalítica intrínseca de la enzima, y que permita un confinamiento parcial, sin pérdida total de los movimientos que permiten el transporte de masa. (Tischer y Wedekind, 1999; Brady y Jordaan, 2009)

3.1.2. Cinética y Actividad Enzimática

Las cantidades de enzima pueden ser expresadas en unidades másicas, no obstante resulta más ventajoso cuantificarlas en términos de actividad enzimática. La actividad enzimática es una medida cuantitativa de la cantidad de enzima activa presente y del nivel de

eficiencia de la misma. La actividad (E.A.) matemáticamente expresa la cantidad de sustrato convertido por unidad de tiempo, teniendo en cuenta el volumen de reacción, (Garrido A, 2009) como se muestra en la siguiente ecuación:

Ecuación 1: Expresión matemática de la Actividad Enzimática:

$$E.A. = \frac{S_f - S_o}{E_o(t_f - t_o)}$$

donde: S y S_o son las concentraciones del sustrato a tiempo t y a tiempo cero (t_o), respectivamente. E_o corresponde a la masa de enzima por unidad de volumen de reacción. (Roskoski, 2011)

Casi todas las enzimas son mucho más grandes que los sustratos sobre los que actúan, y sólo una pequeña parte de la enzima (alrededor de 3 a 4 aminoácidos) está directamente involucrada en la catálisis. La región que contiene estos centros encargados de catalizar la reacción es denominada sitio activo. (Berg, Tymoczko y Stryer, 2013) La actividad de las enzimas puede ser afectada por otras moléculas. Los inhibidores enzimáticos son moléculas que disminuyen o imposibilitan la actividad de las enzimas, mientras que los activadores son moléculas que incrementan dicha actividad. Muchas drogas o fármacos son moléculas inhibidoras que compiten con el sustrato por el sitio activo de la enzima (Berg, Tymoczko y Stryer, 2013).

Asimismo, gran cantidad de enzimas requieren de cofactores para su actividad. Un co-factor es una molécula pequeña necesaria para la actividad de muchas enzimas. Los co-factores son iones metálicos o moléculas orgánicas que participan con las enzimas en la realización de una actividad enzimática y cuya función principal es sufrir las transformaciones químicas necesarias (oxidación y reducción, entre otras) para llevar a cabo la catálisis enzimática. A los co-factores de naturaleza orgánica se les conoce como co-enzimas. Igualmente, la actividad es afectada por la temperatura, el pH, la concentración de la propia enzima y del sustrato, y otros factores físico-químicos (Fischer, Holliday y Thornton, 2010).

Las enzimas son generalmente proteínas globulares que pueden presentar tamaños muy variables. Las actividades de las enzimas vienen determinadas por su estructura tridimensional, la cual viene a su vez determinada por la secuencia de aminoácidos que las conforman (Schäfer *et al.*, 2006; Johnson, 2013).

La cinética enzimática es el estudio de las reacciones enzimáticas, es decir, de cómo las enzimas se unen a los sustratos y los transforman en productos. Los datos de equilibrios utilizados en los estudios cinéticos son obtenidos mediante ensayos enzimáticos. El químico alemán Leonor Michaelis y su becaria Maud Leonora Menten desarrollaron la cinética conocida como de Michaelis-Menten (Dunn, 2005). Posteriormente se obtuvieron las ecuaciones cinéticas que se encuentran tan ampliamente extendidas en la actualidad. Más tarde se desarrollaron mecanismos de reacción para comprender cómo se llevaban a cabo estas reacciones enzimáticas. La Figura 19 permite comprender el mecanismo de acción de las reacciones enzimáticas, dichas reacciones se dividen en dos etapas. En la primera, el sustrato se une reversiblemente a la enzima, formando el complejo enzima-sustrato. En la segunda, la enzima cataliza la reacción y libera el producto.

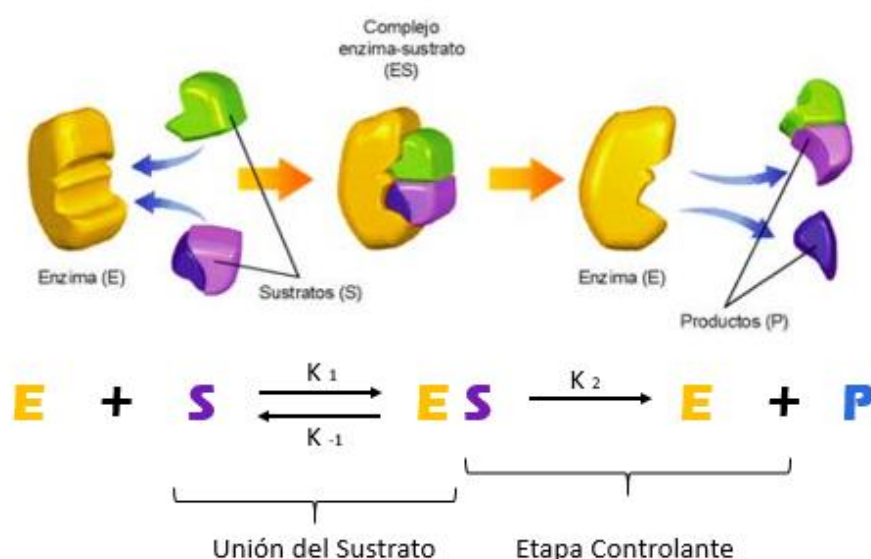


Figura 19: Mecanismo de reacción enzimática. (Wilson, 2010)

Las enzimas pueden catalizar hasta varios millones de reacciones por segundo. Las velocidades de las enzimas dependen de las condiciones de la solución y de la concentración de sustrato. La mayoría de las enzimas, al igual que el resto de las proteínas, pueden ser desnaturalizadas si se ven sometidas a agentes desnaturalizantes como el calor o los pHs extremos. (Thudi *et al.*, 2012) Estos agentes destruyen la estructura terciaria de las proteínas de forma reversible o irreversible, dependiendo de la enzima y de la condición.

Aquellas condiciones que desnaturalizan una proteína, como temperaturas elevadas, pHs extremos o altas concentraciones de sal, dificultan o impiden la actividad enzimática, mientras que elevadas concentraciones de sustrato tienden a incrementar la actividad. Para

encontrar la máxima velocidad de una reacción enzimática, la concentración de sustrato se incrementa hasta que se obtiene una tasa constante de formación de producto, tal como se muestra en la Figura 20. (Murray y Davis, 2003)

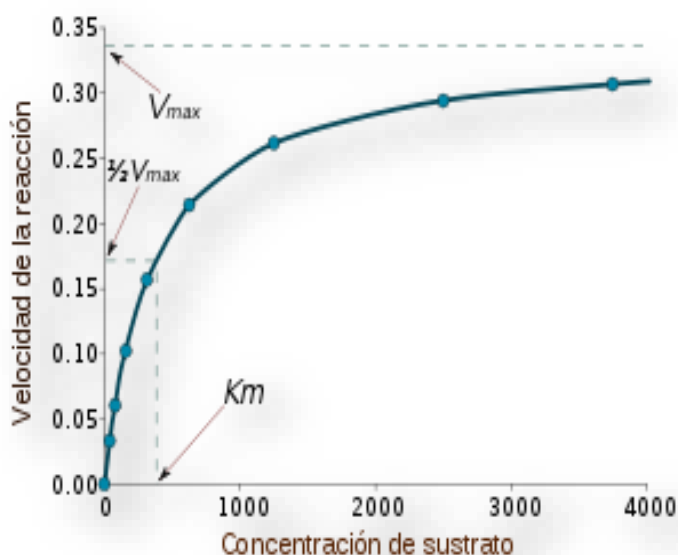


Figura 20: Tendencia de la cinética de Michaelis-Menten para un sustrato genérico. (Murray y Davis, 2003)

La saturación ocurre porque, cuando la concentración de sustrato aumenta, disminuye la concentración de enzima libre, que se convierte a la forma con sustrato unido (ES). A la máxima velocidad (v_{max}) de la enzima, todos los sitios activos de dicha enzima se encuentran ocupados por el sustrato, y la cantidad de complejos ES es igual a la cantidad total de enzima (Roskoski, 2011). Sin embargo, v_{max} es sólo una de las constantes cinéticas de la enzima, la cantidad de sustrato necesario para obtener una determinada velocidad de reacción también es importante. Este parámetro viene dado por la constante de Michaelis-Menten (κ_m), que representa la concentración de sustrato necesaria para que una enzima alcance la mitad de su velocidad máxima. (Johnson and Goody, 2011) Cada enzima tiene un valor de κ_m característico para un determinado sustrato, el cual pretende informar cuan afín es la unión entre el sustrato y la enzima. Otra constante útil es k_{cat} , que es el número de moléculas de sustrato procesadas por cada sitio activo por segundo. (Dunn, 2005; Johnson y Goody, 2011)

La eficiencia de una enzima puede ser expresada en términos de la relación k_{cat}/κ_m , en lo que se denomina constante de especificidad, que incorpora la constante de velocidad de todas las fases de la reacción. (Dunn, 2005) Debido a que la constante de especificidad contempla tanto la afinidad como la capacidad catalítica, es un parámetro de gran utilidad para comparar

diferentes enzimas o la misma enzima con diferentes sustratos. El valor máximo teórico de la constante de especificidad es denominado límite de difusión y tiene un valor aproximado de $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Mateo *et al.*, 2007). Llegados a este punto, cada colisión de la enzima con su sustrato da lugar a la catálisis, con lo que la velocidad de formación de producto no se ve limitada por la velocidad de reacción, sino por la velocidad de difusión. Las enzimas que poseen esta propiedad son llamadas enzimas catalíticamente perfectas o cinéticamente perfectas. (Johnson, 2013)

Las enzimas involucradas en el proceso de producción de bioetanol a nivel industrial son la alfa-amilasa (Amy) y la β -amilasa (Gmy). La Amy, es un enzima hidrolasa que tiene la función de catalizar la reacción de hidrólisis de los enlaces β -1,4-glicosídicos de carbohidratos mayores como almidón para formar azúcares simples. La levadura utilizada en este proceso puede entonces alimentarse de esos azúcares simples y convertirlos en productos de fermentación. Las células de la levadura contienen amilasas, pero necesitan tiempo para fabricar la suficiente cantidad para romper el almidón. Este es el motivo por el cual las técnicas modernas de producción incluyen α -amilasas y β -amilasas para facilitar la digestión del almidón y acelerar estos procesos. (Schäfer *et al.*, 2006; Binod *et al.*, 2011)

La β -amilasa es la enzima que convierte la maltosa y otras dextrinas en glucosa, pertenece a la familia de las disacaridasas, que son las enzimas que se encargan de romper los disacáridos en los monosacáridos que los conforman. (Schäfer *et al.*, 2006) Ambas enzimas tienen actividad enzimática óptima a 50°C y un pH de 5,2-5,5. (Sivaramakrishnan *et al.*, 2007) su constitución proteica las hace susceptibles a la degradación por muchos microorganismos y agentes bacterianos, luego de un tiempo de permanencia en solución acuosa mayor a 24 h. Por esta razón, y para evitar incrementar aún más los tiempos de degradación, el agua de procesos debe someterse a un tratamiento biosida previo. Debido a la alta especificidad enzimática, pequeñas variaciones de las condiciones de operación producen la rápida degradación de la enzima y la consecuente pérdida de su funcionalidad. La solución madre de enzimas debe ser almacenada en recipientes cerrados en ambientes fríos y secos y debe ser protegida de los rayos solares.

3.2. Materiales y Métodos Experimentales

3.2.1. Materiales

Todos los reactivos químicos utilizados fueron de calidad analítica (Sigma-Aldrich/Cicarelli), excepto alginato de sodio que fue de calidad alimenticia (Modernist Pantry). Las enzimas α -amilasas (Amy) de *Aspergillus oryzae* Novocymes Avantec® fueron generosamente suministradas por Bio 4 (Bioetanol Río Cuarto S.A.) y utilizadas tal como fueron recibidas.

3.2.1.1. Preparación de Enzimas Inmovilizadas

La inmovilización enzimática se llevó a cabo mediante tres distintos métodos de inmovilización (Figura 21) y utilizando dos matrices de inmovilización diferentes. Por un lado, las enzimas fueron atrapadas *in situ* y por adsorción en hidrogeles derivados de monómeros vinílicos, formando una red entrecruzada. Por otro lado, las enzimas fueron encapsuladas formando una membrana semipermeable mediante el polímero natural, alginato de sodio. Estos métodos de inmovilización fueron descriptos en la Sección 2.6.3. En todos los casos, las cantidades de enzimas α -amilasa incorporadas a las matrices de inmovilización fueron reportadas.

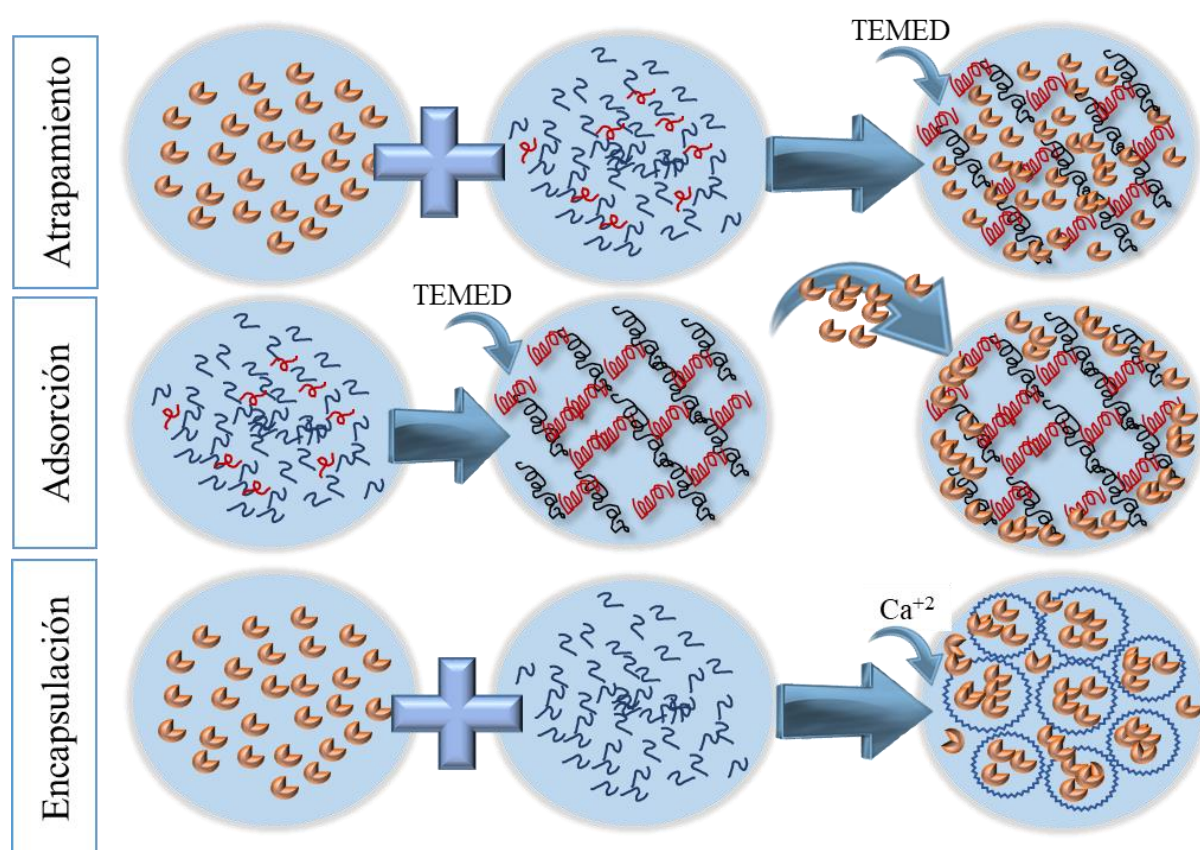


Figura 21: Métodos de inmovilización enzimática.

3.2.1.2. Inmovilización Enzimática por Atrapamiento (IPA)

3.2.1.2.1. Hidrogeles de Poliacrilamida con Enzimas Inmovilizadas

Para la inmovilización enzimática en hidrogeles se utilizó acrilamida (AAm), como precursor monomérico. La estructura química del monómero y su correspondiente unidad repetitiva se muestran en la Figura 22.



Figura 22: Estructura del precursor monomérico (izq.) y unidad monomérica repetitiva (der.).

Como agente entrecruzante o *cross-linker* se utilizó N,N-metilen bisacrilamida (BIS, relación molar 0,02: 1 basado en monómero). La polimerización por radicales libres se inició con el sistema iniciador redox persulfato de amonio (APS) y N,N,N',N'- tetrametilendiamina (TEMED, 10 mL L⁻¹). Las estructuras se mostraron en las Figura 11 y Figura 14.

Todos reactivos químicos (AAm, BIS, APS) excepto TEMED se disolvieron en una solución buffer de fosfato (PBS: 0,1 M, pH 5,8) para constituir la denominada mezcla pre-gelificante (PGM). Enzimas α -amilasas (Amy) en tres distintas proporciones (250, 750, 1250 mg mL⁻¹) fueron añadidas a PGM previa polimerización. Los hidrogeles con enzimas inmovilizadas por entrecruzamiento (PAAm-Amy) gelificaron en moldes cilíndricos de 1 cm de diámetro y una vez formados se almacenaron durante 24 h a temperatura ambiente hasta alcanzar el equilibrio de reacción. A continuación, se cortaron en discos cilíndricos de aproximadamente 1,5 mm de espesor, se lavaron con agua destilada y se secaron durante 48 h a temperatura ambiente y vacío moderado (0,1 atm) para posterior uso.

La secuencia de pasos de preparación de enzimas atrapadas se muestra en la Figura 23. Las composiciones de los hidrogeles con enzimas inmovilizadas se detallan en la Tabla 1.

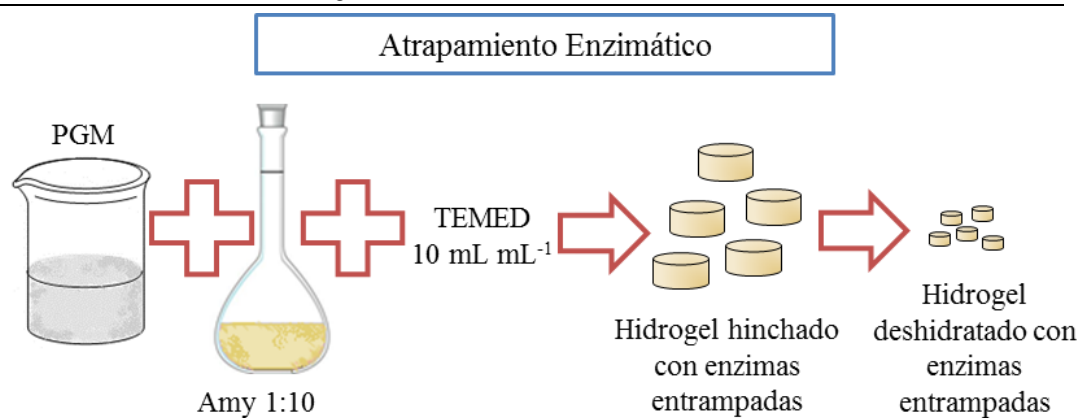


Figura 23: Inmovilización enzimática por atrapamiento.

Tabla 1: Composición de PAAm y PAAm-Amy por IPA. En todos los casos: TEMED, 10 mL L⁻¹.

Material	AAm (M)	Amy (mg mL ⁻¹)	APS (mg mL ⁻¹)	BIS (% M)
PAAm	0,5	0	10	2
PAAm-1	1,0	0	10	2
PAAm-2	1,5	0	10	2
PAAm-3	2,0	0	10	2
PAAm-4	0,5	0	10	4
PAAm-5	1,0	0	10	4
PAAm-6	1,5	0	10	4
PAAm-7	2,0	0	10	4
PAAm-8	1,0	0	30	2
PAAm-Amy-1	0,5	75	10	2
PAAm-Amy-2	0,5	125	30	2
PAAm-Amy-3	0,5	175	50	2
PAAm-Amy-4	0,5	250	50	2
PAAm-Amy-5	1,0	75	10	2
PAAm-Amy-6	1,0	125	30	2
PAAm-Amy-7	1,0	175	50	2
PAAm-Amy-8	1,0	250	50	2
PAAm-Amy-9	1,5	75	10	2
PAAm-Amy-10	1,5	125	30	2
PAAm-Amy-11	1,5	175	50	2
PAAm-Amy-12	1,5	250	50	2
PAAm-Amy-13	2,0	75	10	2
PAAm-Amy-14	2,0	125	30	2
PAAm-Amy-15	2,0	175	50	2
PAAm-Amy-16	2,0	250	50	2
PAAm-Amy-17	0,5	75	10	4
PAAm-Amy-18	0,5	125	30	4
PAAm-Amy-19	0,5	175	50	4
PAAm-Amy-20	0,5	250	50	4
PAAm-Amy-21	1,0	25	10	4
PAAm-Amy-22	1,0	75	30	4
PAAm-Amy-23	1,0	125	50	4
PAAm-Amy-24	1,5	75	10	4
PAAm-Amy-25	1,5	125	30	4
PAAm-Amy-26	1,5	175	50	4
PAAm-Amy-27	2,0	75	10	4
PAAm-Amy-28	2,0	125	30	4
PAAm-Amy-29	2,0	175	50	4

3.2.1.3. Inmovilización por Adsorción (IA)

Las enzimas se agregaron al sistema post-polimerización radicalaria, es decir, se adsorbieron físicamente a la superficie del hidrogel una vez formado este, siguiendo los pasos esquematizados en la Figura 24. Para la inmovilización enzimática por adsorción se utilizó AAm como precursor monomérico, BIS y el par iniciador redox APS-TEMED en las mismas proporciones utilizadas para la IPA. Buffer de PBS fue utilizado como disolvente de la reacción de polimerización a temperatura ambiente. Una vez ocurrida la polimerización, los hidrogeles se lavaron con agua destilada a CNPT durante 24 h, se cortaron en discos cilíndricos de aproximadamente 1,5 mm de espesor y 1 cm de diámetro y se secaron durante 48 h a temperatura ambiente bajo vacío moderado (0,1 atm).

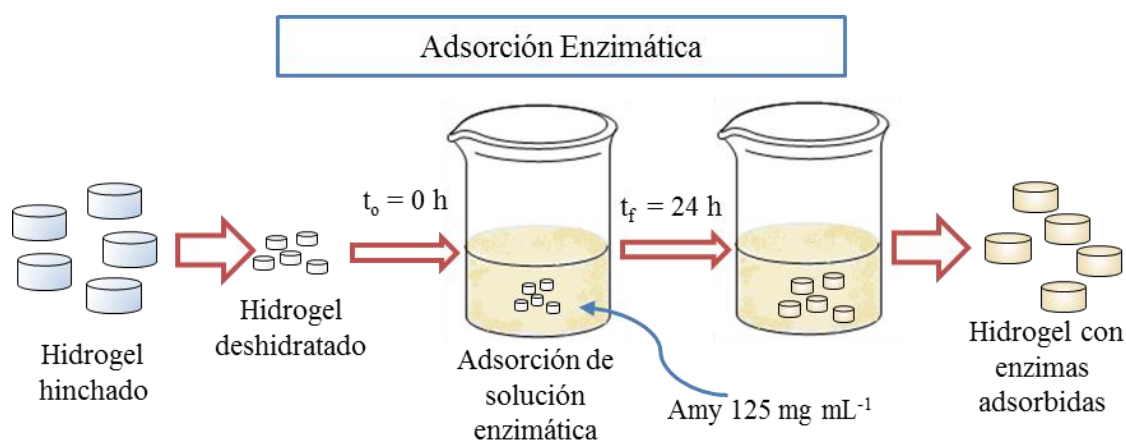


Figura 24: Enzimas inmovilizadas por adsorción.

Pastillas de hidrogel (22 pastillas), previamente deshidratadas, fueron sumergidas en una solución diluida de enzima α -amilasa ($125 \text{ mg Amy mL}^{-1} \text{ sn.}$) en 20 mL de buffer de fosfato (PBS: 0,1 M, pH 5,8) durante 24 h a temperatura ambiente. Para evitar contaminación microbiana los hidrogeles embebidos en solución enzimática se protegieron con una delgada capa de glicerina y resguardaron de radiación UV. La cantidad de enzima absorbida en el hidrogel se midió mediante espectroscopia UV-Visible a 290 nm, monitoreando el cambio absorbancia en la solución en contacto con el gel. Los hidrogeles preparados se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2: Composición molar y contenido enzimático de PAAm-Amy por IA. Para todos los casos: TEMED, 10 mL L⁻¹

Material	AAm (M)	Amy (mg mL ⁻¹) (*)	APS (mg mL ⁻¹)	BIS (% M)
PAAm-Amy-30	0,5	Pura	10	2
PAAm-Amy-31	0,5	125	10	2
PAAm-Amy-32	1,0	Pura	10	2
PAAm-Amy-33	1,0	125	10	2
PAAm-Amy-34	1,0	Pura	20	4
PAAm-Amy-35	1,5	Pura	10	2
PAAm-Amy-36	1,5	125	10	2
PAAm-Amy-37	1,5	Pura	20	4
PAAm-Amy-38	2,0	Pura	10	2
PAAm-Amy-39	2,0	125	10	2
PAAm-Amy-40	2,0	Pura	20	4

(*) Solución para adsorción

3.2.1.4. Encapsulación Enzimática

Esferas de alginato fueron preparadas de acuerdo al procedimiento de Lee *et al.* (Chan, Lee y Heng, 2002) Alginato de sodio (0,30 p/v y 0,50 p/v) conteniendo enzimas α -amilasa (Tabla 3) fue disuelto en buffer de fosfato 0,1 M respetando las proporciones entre componente activo/solución presentadas en inmovilización con hidrogeles. Por otro lado, una solución de cloruro de calcio (0,5 M, Cicarelli) en agua destilada actuó como solución gelificante. El goteo de la solución de alginato-Amy en la solución gelificante produce la formación inmediata de las perlas o esferas semipermeables de alginato (Ver Figura 25). Las perlas se mantienen en la solución de calcio durante 1 hora y posteriormente se lavan con agua destilada, se secan a temperatura ambiente y se almacenan a 4 °C hasta su utilización.

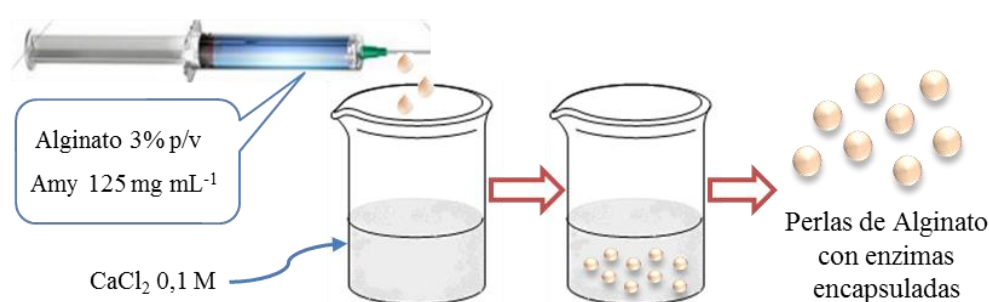
**Figura 25:** Enzimas inmovilizadas en perlas de alginato.

Tabla 3: Composición y contenido enzimático de perlas de alginato con enzimas inmovilizadas. Para todos los casos la gelificación se llevó a cabo en Ca_2Cl 0,5 M.

Material	Alg (% p/v)	Amy (mg mL ⁻¹)
Alg	0,030	000
Alg-Amy-1	0,030	25
Alg-Amy-2	0,030	75
Alg-Amy-3	0,030	125
Alg-Amy-4	0,050	25
Alg-Amy-5	0,050	75
Alg-Amy-6	0,050	125

3.2.1.5. Hidrogeles nanocompuestos de Poliacrilamida-Óxido de Grafeno

3.2.1.5.1. Preparación de Láminas de Óxido de Grafeno

Polvo de grafito natural (Aldrich) se oxidó utilizando el método modificado de Hummers. (Hummers y Offeman, 1958; Chen *et al.*, 2013) El polvo grafitico se añadió a 200 mL de H_2SO_4 concentrado (Cicarelli) sumergido en un baño de hielo. A continuación, se añadió gradualmente KMnO_4 (99 %, Cicarelli) bajo agitación controlada y enfriamiento constante para mantener la temperatura de la suspensión inferior a 20 °C. La reacción se dejó bajo agitación durante 2 h. Posteriormente, se añadieron 360 mL de agua destilada controlando que la temperatura no excediera los 50 °C. Después, se añadieron 40 mL de H_2O_2 (30 %, Fluka) hasta que la mezcla cambió su coloración a amarillo brillante. La mezcla se lavó con agua destilada hasta que el pH alcanzó un valor de 3. El sobrenadante se descartó por centrifugación y la dispersión de óxido de grafito (GO) obtenida se disolvió en H_2O destilada y sometió ultrasonido durante una hora para generar láminas GO. El proceso de preparación de las láminas se resume en la Figura 26.

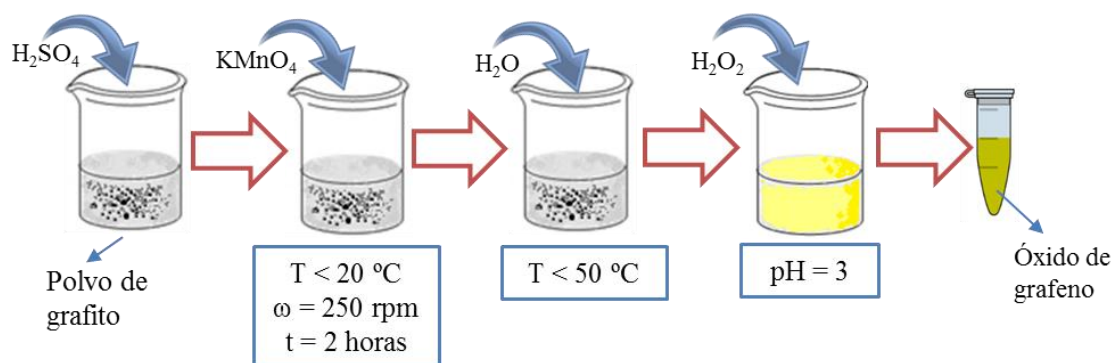


Figura 26: Preparación de láminas de óxido de grafeno

3.2.1.5.2. Preparación de Hidrogeles Nanocompuestos Poliacrilamida-GO

Los hidrogeles cargados con GO se sintetizaron usando los mismos reactivos y proporciones químicas que en IPA, añadiendo 0,5725 % p/v de GO a la PGM. El esquema de preparación se ilustra en la Figura 27. Se prepararon compuestos de hidrogeles de poliacrilamida-GO con y sin enzimas (PAAm-GO-Amy y PAAm-GO, respectivamente), bajo las mismas condiciones, con el fin de utilizarlo como una comparación estándar. Las características de los materiales elaborados se detallan en la Tabla 4.

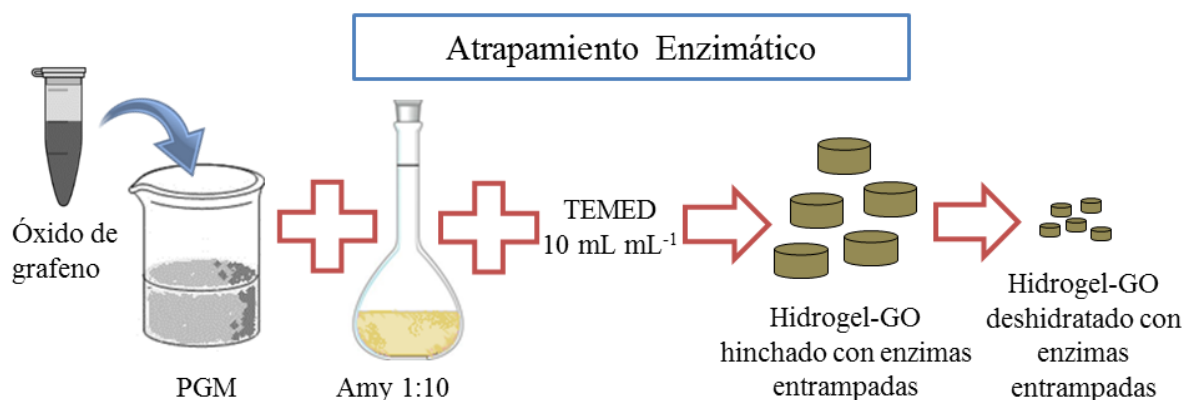


Figura 27: Esquema de inmovilización de enzimas inmovilizadas en hidrogeles de poliacrilamida-grafeno.

Tabla 4: Composición de hidrogeles de PAAm-GO-Amy.

Material	AAm (M)	Amy (mg mL ⁻¹)	APS (mg mL ⁻¹)	GO (p/v)
PAAm-GO	1,0	0	10	0,5725
PAAm-GO-Amy-1	1,0	75	10	0,5725
PAAm-GO-Amy-2	1,0	125	10	0,5725
PAAm-GO-Amy-3	1,0	75	30	0,5725
PAAm-GO-Amy-4	1,0	125	30	0,5725
PAAm-GO-Amy-5	1,0	75	30	1,1450
PAAm-GO-Amy-6	1,0	125	30	1,1450
PAAm-GO-Amy-7	1,5	75	30	1,1450
PAAm-GO-Amy-8	1,5	125	30	1,1450

3.3. Métodos de Análisis y Caracterización

3.3.1.1. Ensayos de Capacidad de Hinchamiento

La capacidad de los hidrogeles para adsorber/desorber agua o soluciones acuosas se conoce como capacidad de hinchamiento o *swelling*. (Baker *et al.*, 1992) La capacidad de hinchamiento de hidrogeles porosos es uno de los rasgos más distintivos de estos materiales y aporta información valiosa acerca de su carácter hidrofílico/hidrofóbico y sus cualidades monolíticas y estructurales. (Hoare y Kohane, 2008; Hoffman, 2012) La cinética de hinchamiento fue medida gravimétricamente, los hidrogeles y/o cápsulas de alginato deshidratados (PAAm-Amy, PAAm-GO-Amy, Alg y Alg-Amy) fueron pesados en balanza analítica y sumergidos en una solución de buffer de fosfato temperatura ambiente y humedad constante. A continuación, se retiró la muestra, se secó superficialmente, se pesó y se colocó nuevamente en la solución. Dicho procedimiento se repitió a intervalos de tiempo regulares hasta que cada muestra alcanzó una masa constante, como se muestra en Figura 28. El estado en el cual la masa de la muestra se mantiene constante se define *swelling* o hinchamiento de equilibrio (w_{eq}).

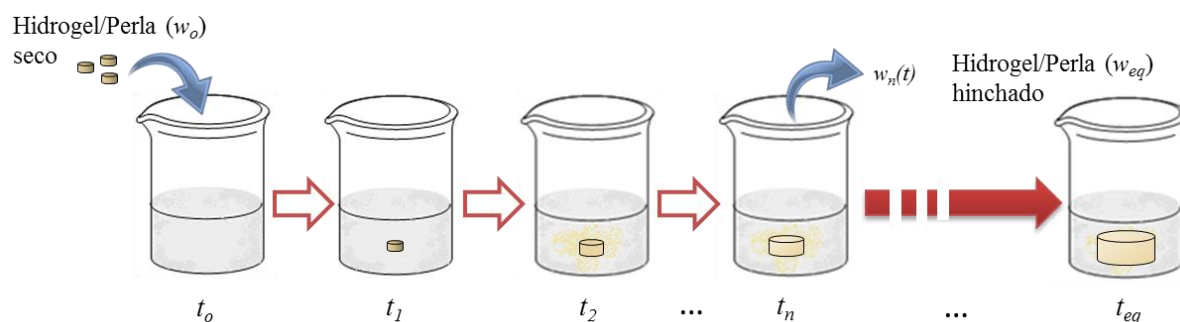


Figura 28: Procedimiento experimental para determinación gravimétrica de cinética de hinchamiento.

El porcentaje de hinchamiento (% S_w) se calculó de acuerdo con la Ecuación 2, en función del tiempo. Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado.

Ecuación 2: Cinética de hinchamiento:

$$\% S_w = \frac{w(t) - w_o}{w_o} \times 100$$

donde: $w(t)$ representa el peso de hidrogel en estado hinchado en el instante t y w_o es el peso del hidrogel seco.

Con el fin de producir una reacción catalítica eficiente, se monitoreó la velocidad inicial hinchamiento y el hinchamiento en equilibrio. La velocidad inicial de hinchamiento se determinó por la pendiente inicial del gráfico de cinética.

3.3.1.1.1. Estudios de Incorporación y Liberación Enzimática

3.3.1.1.2. Eficiencia de Incorporación Enzimática mediante Métodos Gravimétricos

Se estudió la capacidad de la matriz para incorporar la enzima (eficiencia de incorporación) durante el procedimiento de polimerización, midiendo la cantidad de enzima libre presente en la solución de polimerización residual. La eficiencia de incorporación del procedimiento de inmovilización se define por la Ecuación 3.

Ecuación 3: Eficiencia de Inmovilización

$$\% \eta = \frac{w_i - w_r(t)}{w_r(t)}$$

donde: w_i es la masa inicial de la enzima incorporada en la matriz, $w_r(t)$ es la masa restante en el medio de reacción residual.

Se midió la absorbancia de la solución residual a 260 nm, donde presenta una banda ancha asociada a la presencia de aminoácidos aromáticos de proteínas. (Kumar, Sharma y Kalonia, 2005) Por ello, se utilizó espectroscopia UV-Visible (Hewlett-Packard-8453 UV-Vis). El valor $w_r(t)$ se determinó usando una curva de calibración de la solución enzimática a 260 nm.

3.3.1.2. Eficiencia de Liberación Enzimática mediante Espectroscopia UV-Visible

La capacidad para retener las enzimas de los hidrogeles y perlas de alginato se analizó mediante el control de la liberación enzimática de la matriz de soporte después de la polimerización. Experimentalmente, una pieza cilíndrica de hidrogel o perlas de peso similar en estado deshidratado, fueron sumergidas en 10 mL de agua destilada, tal y como se esquematiza en la Figura 29. La concentración de la enzima restante en la solución en diferentes tiempos se determinó por espectroscopia UV-Visible a 290 nm y simultáneamente, se midió la masa de los materiales $w_i(t)$. El porcentaje de enzima remanente a un tiempo t se estimó utilizando la Ecuación 4. Las mediciones de absorbancia se tomaron a tiempos de inmersión regulares durante 24 h con el fin de obtener la retención del rendimiento enzimático.

Ecuación 4: Eficiencia de Liberación Enzimática

$$Enz \% = \frac{w_o - C_s(t) * (w_i(t) - w_o)/\rho}{w_o} \times 100$$

donde: $Enz \%$, es el porcentaje restante de enzimas inmovilizadas; $C_s(t)$, es la concentración de enzimas liberadas en la solución de lavado; $w_i(t)$ es la masa de muestra en el tiempo t ; w_o es la masa inicial del gel en tiempo cero; $w_i(t) - w_o$ es la masa de agua adsorbida en el tiempo t , y el ρ es la densidad del agua.

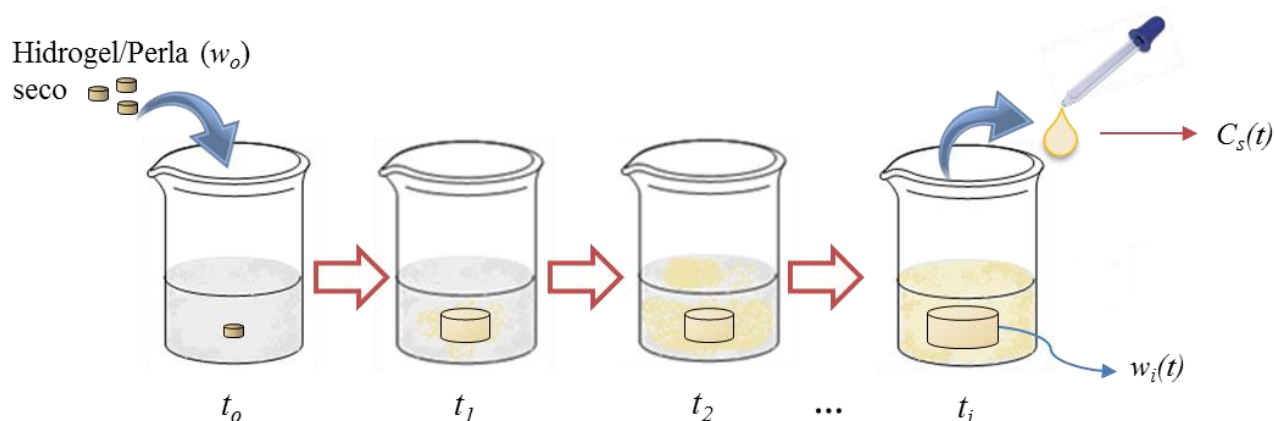


Figura 29: Procedimiento experimental de medición de eficiencia de liberación enzimática.

3.3.1.3. Análisis Enzimático mediante Espectroscopia de Fluorescencia

Para analizar la preservación de la estructura cuaternaria de las proteínas en las enzimas, como indicador del mantenimiento de la actividad enzimática; se midió la emisión de fluorescencia de aminoácidos de triptófano ($\lambda_{em} = 340$ nm; $\lambda_{exc} = 280$ nm) de las enzimas después del proceso de inmovilización. (Moon y Fleming, 2011; Moyano *et al.*, 2013) Las mediciones se tomaron de la solución de lavado a intervalos de tiempos regulares durante 24 h, siguiendo un procedimiento similar al bosquejado en la Figura 29. Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado. También se informó la desviación estándar de los datos cinéticos para todos los materiales ensayados.

3.3.1.4. Análisis de espectroscopia FT-IR

De todas las caracterizaciones susceptibles a ser realizadas a un compuesto orgánico, la que mayor información aporta acerca de su estructura es la espectroscopia infrarroja. Esta espectroscopia se fundamenta en la absorción de la radiación IR por las moléculas en vibración. Una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja cuando dicha energía incidente sea igual a la necesaria para que se dé una transición vibracional de la molécula (tensión simétrica y asimétrica, flexión simétrica y asimétrica en el plano y fuera del plano).

La reflexión total atenuada (ATR) es una técnica de muestreo utilizada en conjunción con la espectroscopia infrarroja que permite examinar las muestras directamente en estado sólido o líquido sin necesidad de más preparación. La técnica, que se empezó a emplear hace medio siglo, se basa en la reflexión experimentada por la radiación en la interfaz de separación

de dos medios de distinta densidad óptica o índice de refracción (n), cuando esta proviene del medio más denso. Se producen dos fenómenos: la refracción y la reflexión, observándose más este segundo fenómeno cuanto mayor es el ángulo de incidencia (Figura 30). Superado cierto valor de dicho ángulo, denominado ángulo crítico (θ_c), que es función de los n de ambos medios, se produce la reflexión total de la radiación. (Fahrenfort, 1961)

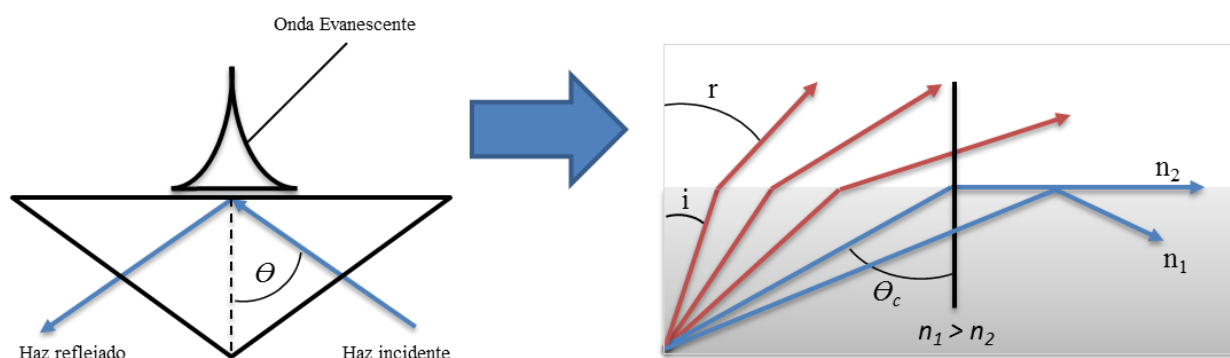


Figura 30: Reflexión total atenuado (ATR) principio de funcionamiento.

Un haz de luz infrarroja se hace pasar a través del cristal ATR de tal manera que se refleja al menos una vez fuera de la superficie interna en contacto con la muestra. Esta reflexión forma la onda evanescente que se extiende dentro de la muestra. La profundidad de penetración en la muestra es típicamente entre 0,5 y 2 micrómetros, siendo determinado el valor exacto por la longitud de onda de la luz, el ángulo de incidencia y los índices de refracción para el cristal ATR y el medio sondeado. El número de reflexiones puede variarse variando el ángulo de incidencia, tal como se indica en Figura 31. El haz es entonces recogido por un detector a medida que sale del cristal. (Elmer, 2005)

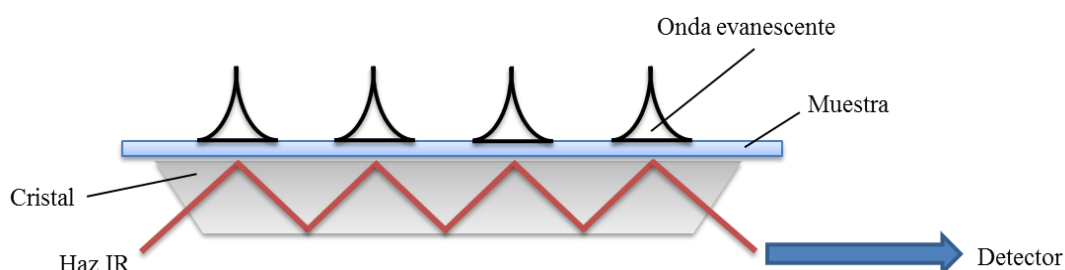


Figura 31: Esquema de funcionamiento de ATR.

Este efecto evanescente sólo funciona si el cristal está hecho de un material óptico con un índice de refracción mayor que la muestra que se estudia. De lo contrario se perderá luz en la muestra. Debido a que la onda evanescente en la muestra sólida se mejora con un contacto más íntimo, generalmente las muestras sólidas se sujetan firmemente contra el cristal ATR, de

modo que el aire atrapado no es el medio a través del cual la onda evanescente viaja, ya que distorsionará los resultados. La relación señal/ruido obtenida depende del número de reflexiones, pero también de la longitud total de la trayectoria óptica de luz que amortigua la intensidad.

Con el fin de observar los distintos grupos funcionales de los monómeros dentro de la estructura del polímero y cómo afecta la incorporación de enzimas al hidrogel, se realizaron espectros ATR sobre hidrogeles de poliacrilamida con y sin enzimas inmovilizadas. Los hidrogeles fueron previamente secados a vacío durante 48 h y triturados en mortero de ágata. Se utilizó un espectrofotómetro IR-ATR (Perkin Elmer Spectrum 2) los espectros fueron colectados con una resolución de 4 cm^{-1} y 100 lecturas (scans) para cada muestra. Las medidas se realizaron por transmisión en el rango de 700 a 4000 cm^{-1} .

3.3.1.5. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Cuando un haz de electrones finamente colimado interactúa con un blanco se producen varios fenómenos físicos en un pequeño volumen. Estos fenómenos se caracterizan por la radiación electromagnética que tiene su origen en el frenado y dispersión de los electrones incidentes y en la ionización de los átomos del blanco o *target*. El análisis de la diversidad de señales originadas con un haz de electrones (electrones secundarios y retro-difundidos, radiación electromagnética, etc.) brinda información detallada y útil sobre la topografía y la composición en regiones muy pequeñas de las muestras analizadas, permitiendo obtener imágenes que ayudan a una mejor interpretación de los resultados experimentales. Esas imágenes tienen la peculiaridad de presentar toda la superficie analizada, siendo por ello ideales en la caracterización morfológica de muestras biológicas.

Los electrones incidentes tienen energías que típicamente oscilan entre 5 y 30 kV, y penetran dentro de la muestra hasta una distancia de alrededor de $1\text{ }\mu\text{m}$, difundiéndose lateralmente otro tanto; esta dispersión constituye el límite para la resolución espacial de la técnica. La sonda de electrones es uno de los instrumentos más poderosos para la caracterización de materiales de diverso origen. Sobre las muestras de hidrogeles se realizó un *coating* de oro. Se observó la estructura interna de los hidrogeles mediante microscopía electrónica de barrido a bajo vacío de alta resolución equipado con un cañón de emisión de campo (FEI) Strata DB 235 a un voltaje de aceleración de 5 kV.

3.3.1.6. Propiedades Mecánicas

3.3.1.6.1. Ensayos Estáticos de Compresión Uniaxial

El módulo de Young o módulo de elasticidad longitudinal es un parámetro que caracteriza el comportamiento de un material elástico, según la dirección en la que se aplica una fuerza. (Martínez *et al.*, 2015) Un cambio en la forma de un material debido a la aplicación de una fuerza es una deformación. Para pequeñas deformaciones se cumple la Ley de Hook, en la cual dos características importantes son observadas. Primero, el objeto vuelve a su forma original cuando la fuerza es removida (deformación elástica). Segundo, la amplitud de la deformación (ΔL) es linealmente proporcional a la fuerza aplicada (F). La Figura 32 representa esquemáticamente el esfuerzo desarrollado por un material genérico en función de la fuerza de compresión aplicada.



Figura 32: Deformación (*strain*) desarrollado por un material elástico genérico en función de la fuerza de compresión aplicada (*stress*).

Experiencias de determinación de módulo de elasticidad para matrices de inmovilización prístinas y con distintas cargas enzimáticas fueron realizadas. El módulo de elasticidad se midió aplicando sobre un cilindro de hidrogel o perla de alginato en estado de hinchamiento de equilibrio una fuerza de compresión (σ) constante desde su estado de relajación hasta la compresión total del mismo y registrando el grado de deformación elástica (ϵ) alcanzada, según las Ecuación 5 y Ecuación 6. Las medidas fueron realizadas a temperatura y presión atmosférica y humedad constante.

Ecuación 5: Fuerza de compresión por unidad de área

$$\sigma = \frac{F}{A}$$

Ecuación 6: Deformación Elástica

$$\varepsilon = \frac{\Delta L}{L} = \frac{L_n - L}{L}$$

donde: F , A , L_n y L son la fuerza de compresión, área transversal, longitud final y longitud inicial de la cápsula de hidrogel respectivamente.

Por lo tanto, la pendiente de una gráfica ε Vs. σ , será E , el módulo de Young, representado en la Ecuación 7.

Ecuación 7: Módulo de Elasticidad

$$E = \frac{\text{tensión}}{\text{deformación}} = \frac{\frac{F}{A}}{\frac{\Delta L}{L}}$$

Las partes principales del dispositivo empleado para realizar las medidas de módulo de elasticidad se muestran en la Figura 33. El cilindro de hidrogel en relación largo/diámetro 2:1 se coloca sobre una balanza analítica digital. La fuerza (compresión uniaxial) es transmitida verticalmente al gel a través de un actuador o tornillo micrométrico provisto de una placa de vidrio terminal. El esfuerzo (σ), se calcula a partir de la fuerza que actúa sobre gel y el área transversal del cilindro y tiene unidades de presión (N m^{-2}). Los valores de masa registrados desde la balanza analítica se afectan por la aceleración de la gravedad (g) y se calcula la fuerza como $F = m g$. Un sensor de desplazamiento (palpador digital) permite determinar la deformación (ΔL) a cada momento de la experiencia.

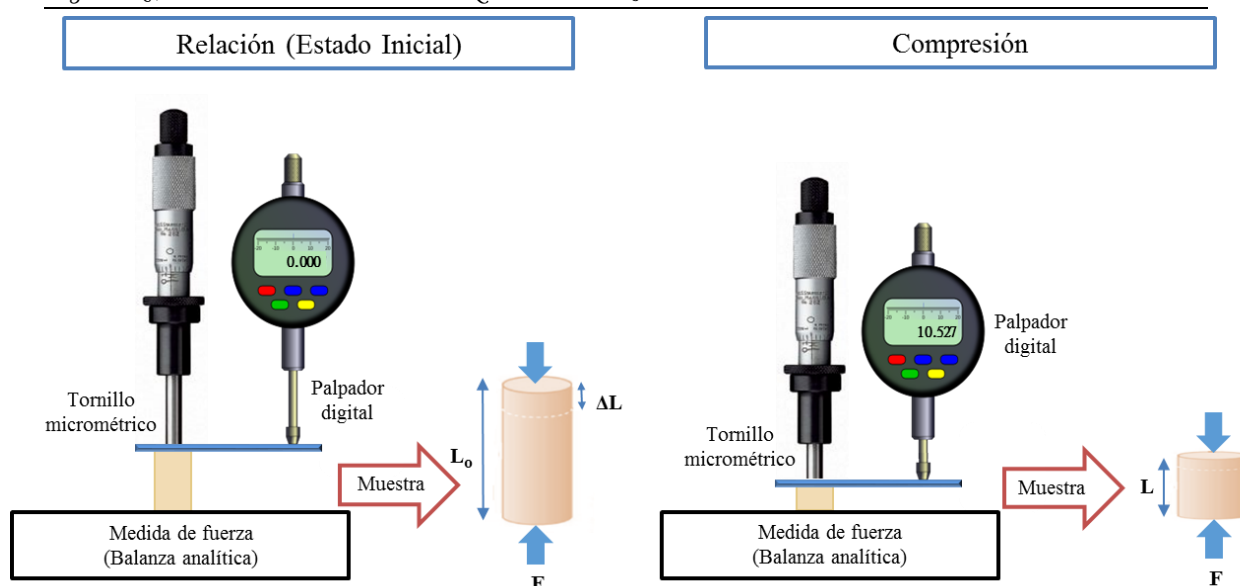


Figura 33: Sistema de medición de módulos de elasticidad de hidrogeles cilíndricos

3.3.1.6.2. Análisis de fatiga mediante ensayos Mecánico Dinámicos

El análisis mecánico dinámico (*Dynamic Mechanical Analysis* o DMA) es un análisis utilizado en estudios de procesos de relajación y en reología, para estudiar y caracterizar el comportamiento de materiales viscoelásticos y sus respuestas ante impulsos, estrés y deformación en tiempo y frecuencia. (Menard, 2008) El DMA suministra una fuerza oscilatoria, provocando un esfuerzo sinusoidal, que genera una deformación sinusoidal al ser aplicada a la muestra (Ver Figura 34). Si el material que se está evaluando es puramente elástico, la diferencia de fase (δ) entre la fuerza aplicada y la deformación de las ondas sinusoidales es 0° (es decir, están en fase). Si el material es puramente viscoso, la diferencia de fase es de 90° . Sin embargo, los materiales reales, entre estos los polímeros, son viscoelásticos y muestran una diferencia de fase entre esos extremos. (Ehrenstein, Riedel y Trawiel, 2004)

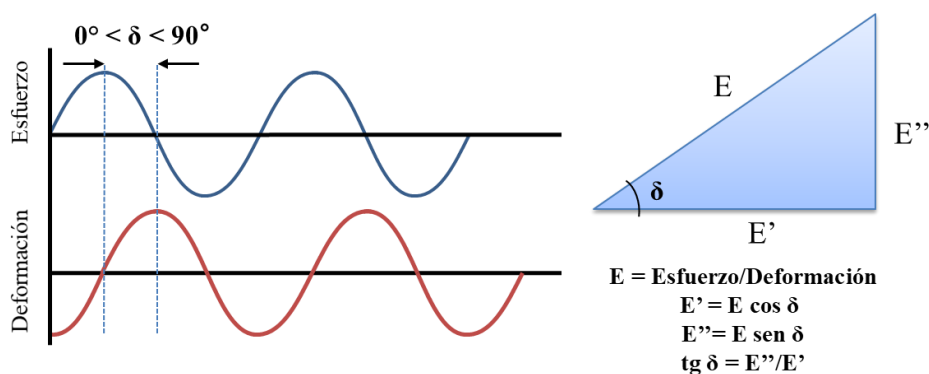


Figura 34: Comportamiento viscoelástico. (Menard, 2008)

La señal de respuesta (deformación, ϵ), se divide una parte "en fase" y una parte "fuera de fase". Los resultados de esta operación matemática son el módulo de almacenamiento E' (relacionado con la respuesta reversible, "en fase") y el módulo de pérdida E'' (en relación a la respuesta irreversible, "fuera de fase"). El factor de pérdida $\tan \delta$ es la relación entre el módulo de pérdida y el módulo de almacenamiento ($\tan \delta = E''/E'$). Generalmente, el módulo de almacenamiento (E') se refiere a la rigidez del material mientras que el módulo de pérdida (E'') es una medida de la energía de oscilación transformada en calor. La $\tan \delta$ caracteriza la amortiguación mecánica o la fricción interna de un sistema visco-elástico (Martínez *et al.*, 2015).

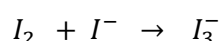
Ensayos de fatiga para las matrices de inmovilización fueron realizados mediante ensayos de compresión dinámica mediante el equipo DMA 242 E Artemis, Netzsch. Las mediciones de DMA se llevaron a cabo en modo "fuerza controlada" (CF-mode). Los materiales hidratados previamente fueron sujetos entre las placas paralelas de una pinza de compresión. En el modo fuerza controlada se aplicó una rampa de fuerza de 0,01 a 1 N a una velocidad de $0,1 \text{ N min}^{-1}$ durante 10 ciclos consecutivos de compresión/relajación. Las medidas fueron realizadas a temperatura y presión atmosférica y por triplicado.

3.3.1.7. Cinética Enzimática de α -amilasa

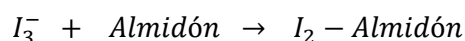
3.3.1.7.1. Cinética Enzimática de la Reacción de Hidrólisis

La cinética de α -amilasa fue determinada siguiendo la reacción de hidrólisis de almidón, de acuerdo al método estándar para determinación de almidón en suero y orina *Amilokit*®, *Weiner Lab*, que utiliza una solución de tri-ioduro (I_2/I^-) que reacciona con almidón no hidrolizado (remanente) lo que da lugar a la formación del complejo coloreado Iodo-almidón (Figura 35). Al hidrolizarse el almidón en azúcares inferiores por acción de la α -amilasa, el color del complejo desaparece. Las reacciones involucradas se presentan a continuación (Reacciones 2 y 3).

Reacción 2: Reacción de Ioduro/triyoduro



Reacción 3: Formación del complejo Iodo-Almidón



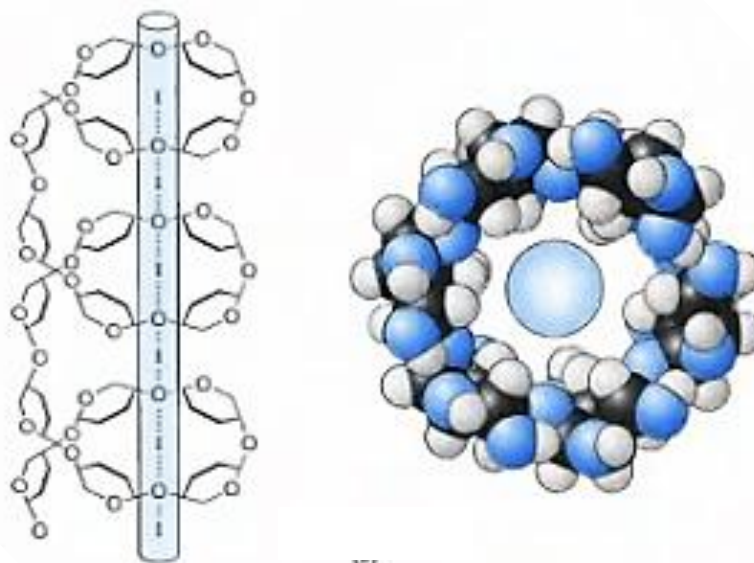


Figura 35: Estructura esquemática del complejo Iodo-almidón. La cadena de amilosa forma una hélice que rodea las unidades de I_2 . (Tester, Karkalas y Qi, 2004)

La reacción de hidrólisis homogénea se lleva a cabo a 37 °C y comienza con el agregado de la enzima (20 μ L de dilución 1:10) a tiempo cero. Para determinar la cinética enzimática se prepararon disoluciones de almidón de concentraciones conocidas (0,02; 0,05; 0,07 y 0,1 g L⁻¹) en buffer de acetato (AcH 0,2 M; AcNa 0,2 M, proporción 1:1, 50 mM, pH 5,8) a partir de una disolución stock de almidón (1 g L⁻¹). Se tomaron cuatro alícuotas (1 mL) de cada dilución a intervalos regulares de tiempo. Para detener (quenchar) la reacción se utilizó 100 μ L de HCl 0,5 N y se enfrió en baño de hielo. Se añadió 1 mL de agua destilada y 40 μ L de solución de I_2 al 2 %. Transcurridos 5 minutos, se leyó la absorbancia a la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción del complejo ($\lambda_{\text{max}} = 590$ nm). La concentración de almidón remanente se determinó previa realización de una curva de calibración en el intervalo de trabajo donde se cumple la linealidad de Lambert y Beer.

Las medidas de espectrofotometría Uv-Vis se realizaron en un espectrofotómetro Hewlett-Packard (HP, 8453) con detector de arreglo de diodos, a una longitud de onda de 590 nm. En todos los casos se utilizaron celdas de cuarzo (*Hellma Analyses*) con paso óptico de 1 cm. Los blancos siempre se realizaron con solventes puros (agua, buffer).

Para los ensayos con α -amilasa inmovilizadas se realizó otra idéntica serie de experimentos, pero en lugar de solución enzimática libre se utilizó equivalente cantidad de enzimas inmovilizadas en hidrogel de acrilamida y en perlas de alginato. Los respectivos análisis cinéticos se realizaron con 20 μ L de enzima α -amilasa libre, con PAA-Amy-3 donde

dos pastillas equivalen a la cantidad de enzima libre y en Alg-Amy donde la cantidad de enzima libre es la aproximadamente la misma a la contenida en cinco perlas de alginato.

3.3.1.7.2. Parámetros Cinéticos de Michaelis-Menten para Reacción de Hidrólisis

El estudio cinético de las reacciones enzimáticas emplea el clásico modelo de Michaelis y Menten (Dunn, 2005; Roskoski, 2011) y responde a la **Ecuación 8**.

Ecuación 8: Cinética de Michaelis-Menten

$$v = \frac{v_{max} [S]}{k_m + [S]}$$

donde: v es la velocidad con la cual el almidón es degradado por la enzima ($\text{g L}^{-1}\text{s}^{-1}$), v_{max} es la velocidad de degradación máxima alcanzable con la concentración dada de enzima, $[S]$ es la concentración de sustrato almidón (g L^{-1}) y k_m es la de constante Michaelis y Menten que describe la afinidad de la enzima por el sustrato.

A partir de la Ecuación 8 se determinaron las cinéticas de consumo de sustrato en función del tiempo. Esta experiencia se realizó para cuatro concentraciones de almidón distintas y para enzimas libres, PAA-Amy y Alg-Amy, sistemas expuestos en la Tabla 1.

Los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten fueron determinados estadísticamente mediante la utilización de la ecuación de Lineweaver-Burk (Ecuación 9), que corresponde a la gráfica doble recíproca de la ecuación de Michaelis-Menten.

Ecuación 9: Linealización de la cinética de Michaelis-Menten

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{k_m}{v_{max}} \frac{1}{[S]}$$

Matemáticamente, la actividad enzimática se define como la cantidad de sustrato degradado por unidad de masa de enzima y por unidad de tiempo y se calcula mediante **Ecuación 10**.

Ecuación 10: Actividad Enzimática

$$AE = \frac{[S]_o - [S]}{E_o(t - t_o)}$$

dónde: $[S]_o$ es la concentración inicial de sustrato (g L^{-1}), $[S]$ la concentración de sustrato en el tiempo t (g L^{-1}), E_o la concentración de enzima inicial (g L^{-1}) y $(t - t_o)$ el tiempo

de reacción. Cada experiencia fue realizada por triplicado. Para los ensayos realizados se partió de un sistema hidratado o en estado hinchado.

3.3.1.7.3. Cinética de Reusabilidad de α -amilasa

La reusabilidad enzimática también fue estudiada mediante ensayos cinéticos, tanto para enzimas libres como inmovilizadas. Nuevamente, se midió mediante absorción UV-Vis el consumo de almidón en función del tiempo para la reacción de hidrólisis, pero en este caso la experiencia se repitió consecutivamente, utilizando los mismos catalizadores y renovando la solución de sustrato (almidón), hasta observar una disminución de la actividad enzimática. Debido a que, en condiciones óptimas de reacción (máxima actividad), la enzima α -amilasa consume la totalidad del almidón hidrolizable inicial en 5 min (300 s.), se estimó un tiempo total de reacción de 10 min de reacción para los ciclos sucesivos, transcurrido este tiempo se consideró finalizada la reacción. Para los ensayos realizados se partió de un sistema hidratado o en estado hinchado.

3.3.1.8. Cinética Enzimática de β -amilasa

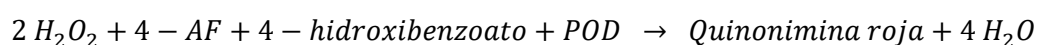
3.3.1.8.1. Estudios Cinéticos de la Reacción de Sacarificación

Los estudios cinéticos de la enzima β -amilasa encargada de convertir dextrinas y disacáridos provenientes de hidrólisis en glucosa, utiliza una metodología similar a la utilizada en la Sección 3.3.1.7.1. La cinética de β -amilasa fue determinada siguiendo la reacción de sacarificación, de acuerdo al método estándar para detección de glucosa en suero, plasma o líquido cefalorraquídeo mediante un kit biológico que implementa un tren enzimático glucosa oxidasa-peroxidasa @Glicemia Enzimática, Weiner Lab. El esquema del kit de reacciones se presenta en las Reacción 4 y Reacción 5.

Reacción 4: Oxidación de Glucosa I



Reacción 5: Oxidación de Glucosa II



donde: GOD, POD, 4-AF se refieren a enzimas glucosa oxidasa, peroxidasa y 4-aminofenazona en buffer de Tris (tris (hidroximetil) aminometano), respectivamente.

A diferencia del método utilizado para la detección del consumo de almidón (sustrato inicial) este método monitorea la producción de glucosa, es decir, la formación de un producto; por lo tanto, previa sacarificación se llevó a cabo la reacción de hidrólisis incrementando un 500 % (100 μL) la cantidad de α -amilasa de forma tal de que sea la reacción de sacarificación la etapa controlante de velocidad. Luego de 15 min de reacción, se comprobó que efectivamente todo el almidón inicial había sido degradado por la enzima α -amilasa arrojando un resultado negativo al test de Iodo-almidón. Una vez finalizada la hidrólisis el sistema se encuentra listo para ser sacarificado.

La reacción de sacarificación se lleva a cabo a temperatura ambiente a pH 7,2 y es estable durante los próximos 60 min luego de iniciada la reacción. Para comenzar la reacción el reactivo de trabajo conteniendo las sustancias indicadas en Reacciones 4 y 5 (Reactivo A) se mezcla con 1 mL de agua destilada y 20 μL de las muestras (provenientes de la reacción de hidrólisis). Transcurridos 2 min se leyó la absorbancia a la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción del colorante quinimina roja (λ_{max} 505 nm). Previamente se realizó de una curva de calibración para glucosa en el intervalo de trabajo que cumple la linealidad de Lambert y Beer, utilizando disoluciones de glucosa de concentraciones conocidas (0,1; 0,2; 0,5; 1 y 2 g L^{-1}) en buffer de fosfato a partir de una disolución stock de glucosa monohidratada (3 g L^{-1}). Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Hewlett-Packard (HP, 8453).

Análogamente y siguiendo con el esquema de trabajo de la Sección 3.3.1.7.2, para los ensayos cinéticos de α -amilasa, para β -amilasa inmovilizadas se realizó otra idéntica serie de experimentos, pero en lugar de solución enzimática libre se utilizó equivalente cantidad de enzima inmovilizada en hidrogel de acrilamida 1 M. Los respectivos análisis cinéticos se realizaron con 20 μL de enzima libre, dos pastillas (que contienen cantidad equivalente de enzima libre) de PAA-Gly-3. No se realizó experiencia alguna de β -amilasa inmovilizada en perlas de alginato.

3.3.1.8.2. Parámetros Cinéticos de Michaelis & Menten y Reusabilidad Enzimática

La determinación de los parámetros cinéticos y el estudio de la reusabilidad enzimática se realizaron en forma similar para β -amilasa involucrando a la reacción de sacarificación correspondiente.

3.4. Resultados y Discusiones

3.4.1. Selección de las Matrices de Inmovilización

A partir de los materiales preparados, se seleccionaron las mejores matrices de entrapamiento. Para ello, se consideró la estabilidad mecánica del material, la eficiencia de inmovilización enzimática y la capacidad de hinchamiento. El criterio de selección obedeció reglas de exclusión del tipo Sí/No. La selección de los materiales resultó de un exhaustivo análisis exploratorio y se describe a lo largo de toda esta sección. Otros materiales, originalmente considerados como matrices de inmovilización y posteriormente descartados para la aplicación deseada se detallan en el Anexo I.

Las matrices de inmovilización seleccionadas para la inmovilización enzimática fueron:

- *PAAm-Amy-6*
- *PAAm-GO-Amy-4*
- *Alg-Amy-2*

Estas matrices de inmovilización fueron caracterizadas y comparadas con los materiales respectivos sin enzimas y con diferentes cargas enzimáticas y contenido de GO. A modo de recapitulación en la Tabla 5 se describen las principales características de estos materiales.

Tabla 5: Matrices caracterizadas para inmovilización enzimática de α -amilasa

Material	AAm (M)/Alg, % p/v	Amy, mg mL ⁻¹	BIS, % M	APS, mg mL ⁻¹	GO, % p/v
<i>PAAm-1</i>	1,0 M	-	2	30	-
<i>PAAm-Amy-5</i>	1,0 M	750	2	30	-
<i>PAAm-Amy-6</i>	1,0 M	1250	2	30	-
<i>PAAm-Amy-7</i>	1,0 M	1750	2	30	-
<i>PAAm-Amy-8</i>	1,0 M	2500	2	30	-
<i>PAAm-GO</i>	1,0 M	-	2	30	0,5725
<i>PAAm-GO-Amy-4</i>	1,0 M	1250	2	30	0,5725
<i>Alg-Amy-2</i>	0,3 p/v	1250	-	-	-

3.4.2. Caracterización de Matrices con Enzimas Inmovilizadas

Los geles poliméricos utilizados para la captura enzimática se caracterizaron por microscopía de SEM. En la Figura 36 se muestra una micrografía de *PAAm-1* en estado

deshidratado (Figura 36.a) y en estado hidratado (Figura 36.b). La superficie se presenta áspera, rugosa y es posible observar poros distribuidos heterogéneamente sobre toda la superficie. La distribución de tamaños de poros podría permitir no sólo el intercambio difusivo libre entre el sustrato (almidón) y los productos de hidrólisis (dextrinas) sino también la difusión enzimática.

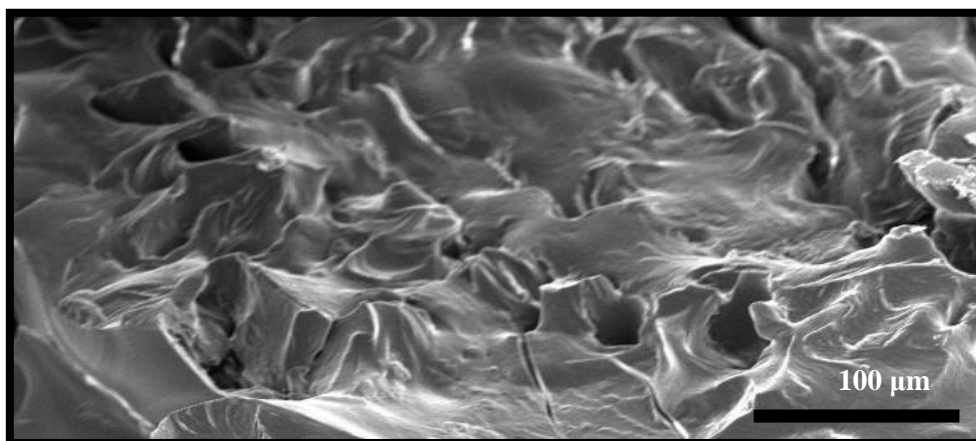


Figura 36: Micrografía SEM de PAAm-1.

Por otro lado, la superficie de PAAm-Amy-6, tiene una apariencia más suave y uniforme que PAAm-1 sin carga enzimática, presentando esta última menor cantidad de poros (Figura 37). El tamaño de los poros pequeños podría reducir parcialmente la fuga de enzimas de la red de hidrogel, constituyendo una estructura *jail-like* que permite el confinamiento parcial en un espacio definido.

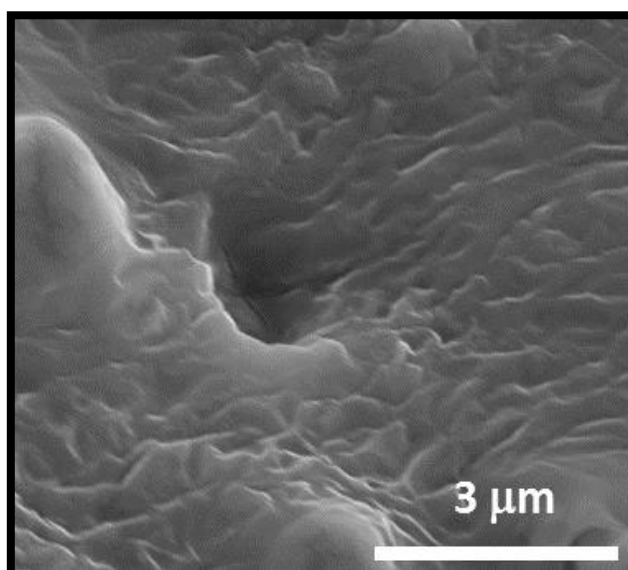


Figura 37: Micrografía SEM PAAm-Amy-6

La Figura 54 muestra la micrografía de un hidrogel de poliacrilamida-GO con enzimas inmovilizadas (PAAm-GO-Amy-4). Se observa una superficie con un aspecto similar a PAAm-Amy-6 pero la incorporación de 5 % GO produce una estructura laminar con una distribución de poros más desarrollada.

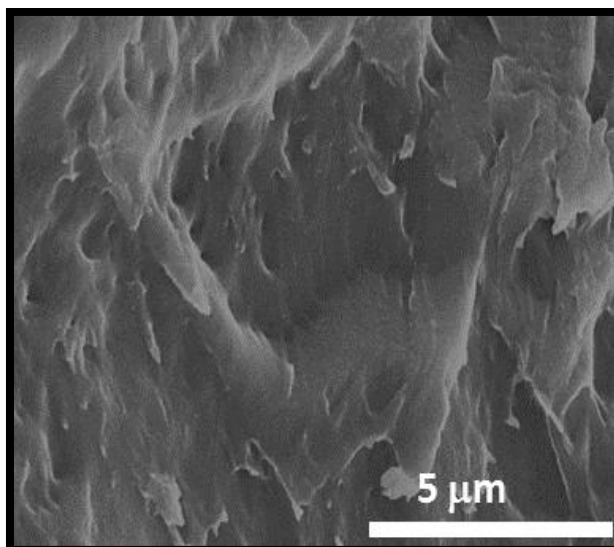


Figura 38: Micrografía SEM PAAm-GO-Amy-4

Por el contrario, las perlas de alginato muestran la superficie más rugosa y no unificada, poco porosa y con varias fracturas de línea (Figura 39).

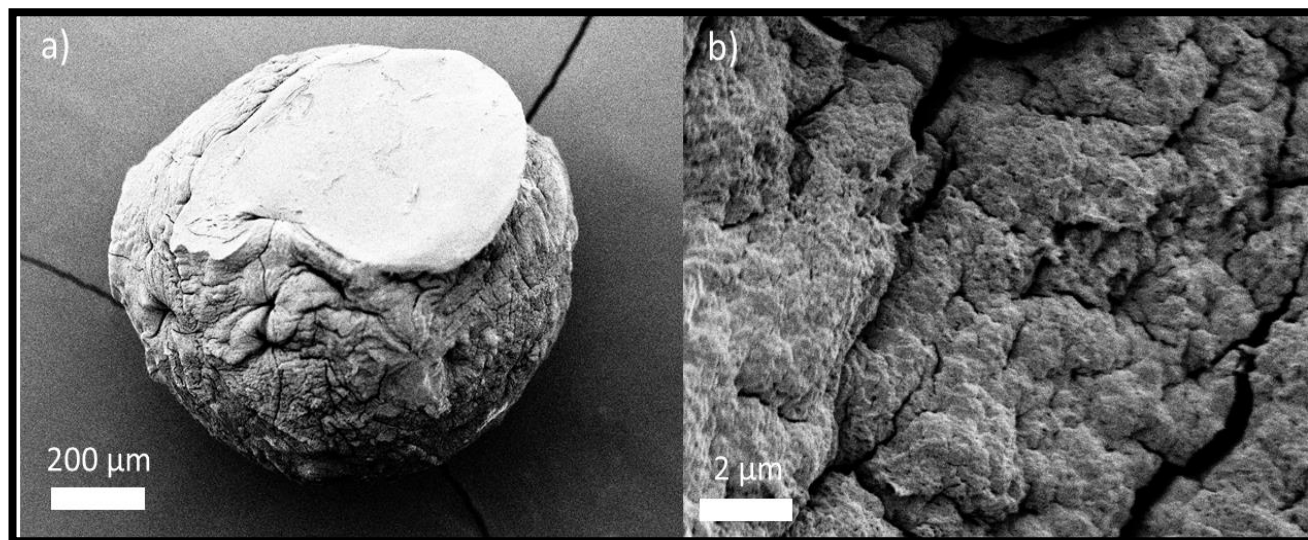


Figura 39: Micrografía SEM a) perla de Alg-Amy-2 b) superficie perla Alg-Amy-2.

3.4.3. Análisis de Hinchamiento (*Swelling*) de Matrices de Inmovilización

Dos parámetros esenciales a tener en cuenta a la hora de analizar la capacidad *swelling* o hinchamiento de un sistema son: la capacidad de hinchamiento de equilibrio y la velocidad inicial de hinchamiento. Por un lado, el hinchamiento de equilibrio está relacionado con el grado de entrecruzamiento (generalmente en correlación con el comportamiento elástico) y el carácter hidrofílico del hidrogel. (Mulko, L., *et al*, 2017) Por otro lado, la velocidad inicial de hinchamiento podría estar relacionada, principalmente, con el carácter hidrofílico.

3.4.3.1. Cinética de Hinchamiento de Hidrogeles de Poliacrilamida

Según se observa en las Figura 40 y Figura 41 las gráficas de porcentaje de hinchamiento en función del tiempo, para las distintas matrices de inmovilización de la Tabla 5, exhibieron curvas de crecimiento exponencial, características de hidrogeles hidrofílicos. (Caykara, Kiper y Demirel, 2006) En todos los casos, el hinchamientos del hidrogel con carga enzimática se encuentran por debajo del hinchamiento típico del hidrogel PAAm-1 en ausencia de enzimas inmovilizadas. La presencia de enzimas, células o cualquier otro componente activo eléctricamente neutro produce interacciones físicas con la matriz del hidrogel, disminuyendo los puntos de entrecruzamiento, tal como fue demostrado por Tischer *et al.* (Tischer y Wedekind, 1999)

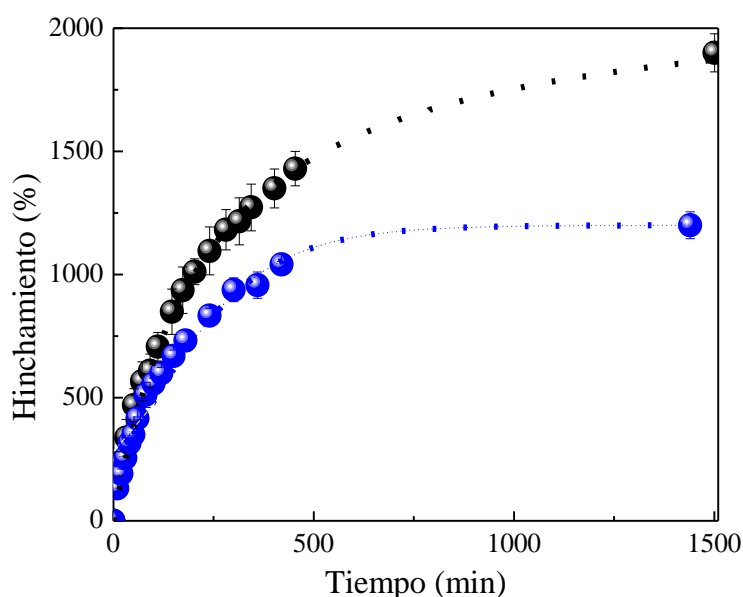


Figura 40: Cinética de hinchamiento para matrices de inmovilización sin enzimas PAAm-1 (●) y con enzimas PAAm-Amy-6 (●).

Como se puede observar en la Tabla 6, el hidrogel prístino de PAAm-1 presenta el mayor valor de hinchamiento de equilibrio, lo que sugiere que esta red tridimensional tiene el menor grado de entrecruzamiento y/o el mayor carácter hidrofílico, en comparación con los otros materiales. Por otro lado, se observa que la incorporación enzimática disminuye la velocidad inicial de hinchamiento, lo que sugiere que el carácter hidrofílico es menor para PAAm-Amy-6 que para el hidrogel PAAm-1. Estos resultados permiten concluir que el PAAm-Amy-6 presenta un mayor grado de entrecruzamiento y un menor carácter hidrofílico en comparación con PAAm-1, hallazgos que son consistentes con los valores de módulo Young o elástico obtenidos para estos materiales. (Caykara, Kiper y Demirel, 2006)

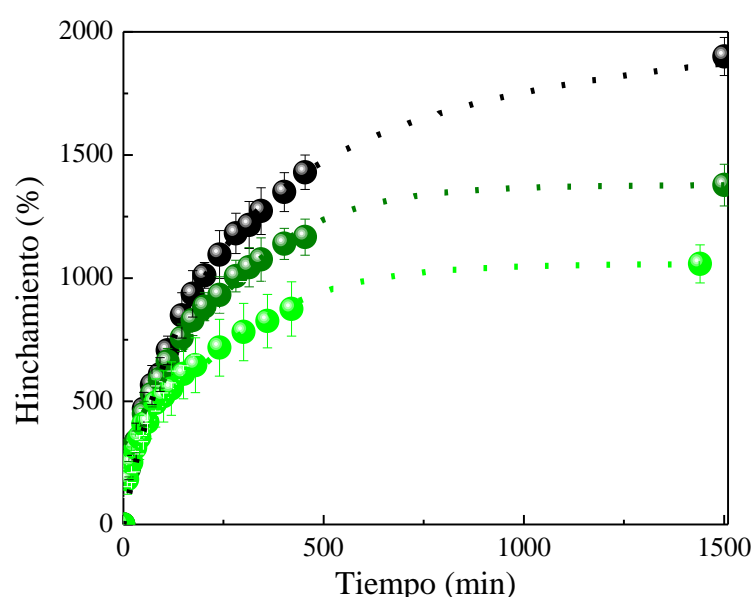


Figura 41: Cinética de hinchamiento para matrices de inmovilización sin enzimas PAAm-1 (●), con óxido de grafeno PAAm-GO (●) y con enzimas PAAm-GO-Amy-4 (●).

El hinchamiento de PAAm-GO disminuye en comparación con PAAm-1 mientras que el módulo de Young aumenta drásticamente (600 %) indicando que la matriz polimérica pura es una red más entrecruzada. Por otro lado, el análisis de la velocidad inicial de hinchamiento permite concluir que el carácter hidrofílico del material es similar al PAAm-1 (Tabla 6).

El PAAm-GO-Amy-4 presenta el valor de hinchamiento de equilibrio más bajo y la velocidad de hinchamiento inicial más alta. Por lo tanto, esta matriz presenta el menor grado de entrecruzamiento con un carácter de hidrofilidad reforzado por la incorporación del óxido de grafeno, resultado que se condice con estudios previos. (Ammar *et al.*, 2016) Estas

características son sumamente deseables en la aplicación propuesta, es decir, la producción de bioetanol, debido a que la alta velocidad inicial permite reducir limitaciones difusionales y un módulo elástico alto permite su uso en varias configuraciones de reactores, por ejemplo, tanque agitado discontinuo, reactor continuo de lecho fijo o reactor semicontinuo tipo *fed-batch*. Por el contrario, debido a su naturaleza química, la capacidad de hinchamiento Alg-Amy-2 es insignificante.

El módulo elástico para matrices de alginato se encuentra en el rango de 155 a 172 ± 7.000 kPa. (Stevens *et al.*, 2004) Los resultados están en total acuerdo con Lee *et al* (Ver Tabla 6). (Lee y Mooney, 2012)

3.4.3.2. Hinchamiento de Equilibrio para Hidrogeles con Carga Enzimática

También se analizó cómo afecta el incremento de la carga enzimática en los distintos hidrogeles de poliacrilamida. La relación entre masa de componente activo (Amy) y el volumen PGS (g mL^{-1}) podría alterar las propiedades mecánicas y el hinchamiento de PAAm-Amy, y así modificar su actividad enzimática, posiblemente debido a problemas difusionales e inhibición de los sitios activos. Por esto, se estudió la capacidad de hinchamiento del sistema PAAm-Amy para las distintas cargas enzimáticas.

Los resultados se muestran en la Figura 42. La disminución del hinchamiento de equilibrio resultó proporcional al incremento de la carga enzimática, observándose una tendencia cuasi lineal entre estos dos parámetros, para el rango de valores analizados. Por encima de una carga enzimática de 250 g L^{-1} la hidro-gelificación no se logra.

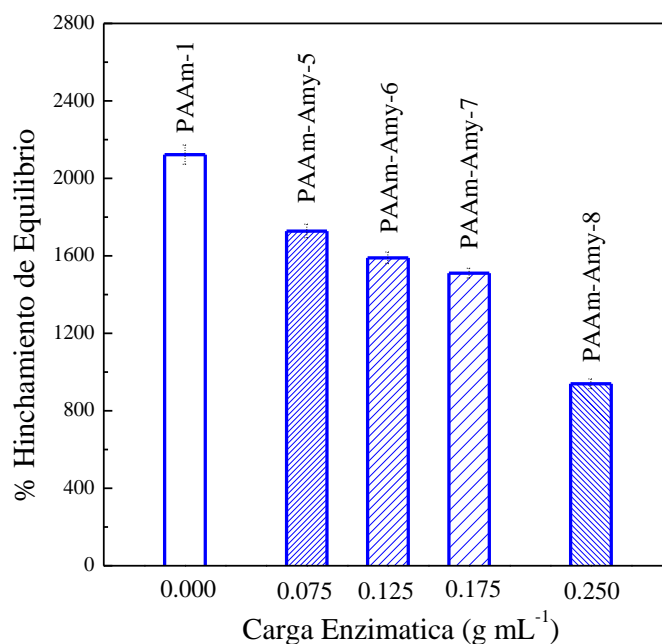


Figura 42: Hinchamiento en equilibrio para hidrogeles de poliacrilamida puros y con distinta carga enzimática polimerizados vía IPA.

Tabla 6: Hinchamiento en equilibrio y velocidad inicial de hinchamiento para matrices de inmovilización con y sin enzimas.

Materiales	Carga enzimática (mg mL ⁻¹)	Hinchamiento de equilibrio (W_{∞}) (%)	v_0 hinchamiento (min ⁻¹)
PAAm	0,000	2123 ± 27	16,52 ± 0,11
PAAm-GO	0,000	1477 ± 34	16,01 ± 0,12
PAAm-Amy-5	75		
PAAm-Amy-6	125		
PAAm-Amy-7	175	1510 ± 32	13,22 ± 0,10
PAAm-Amy-8	250		
PAAm-GO-Amy-2	175	1114 ± 17	18,25 ± 0,20
Alg-Amy-2	175	138 ± 20	0,65 ± 0,05

3.4.4. Propiedades Mecánicas

3.4.4.1. Análisis Mecánico Estático

Se analizó el módulo de elasticidad de las distintas matrices poliméricas, hidrogeles PAAm-1, PAAm-Amy-6, PAAm-GO-Amy-2 y enzimas inmovilizadas en perlas de alginato (Alg-Amy-2). Los resultados se muestran en la Tabla 7. En todos los casos los hidrogeles presentan mayores valores de módulos de elasticidad, es decir, los hidrogeles resultan materiales más elásticos y menos frágiles que las perlas de alginato. Comparando hidrogeles

de poliacrilamida entre sí, la Figura 43 muestra que el comportamiento elástico del hidrogel con enzimas inmovilizadas (PAAm-Amy-6) resulta disímil al del hidrogel puro PAAm-1, perdiendo significativamente su carácter elástico.

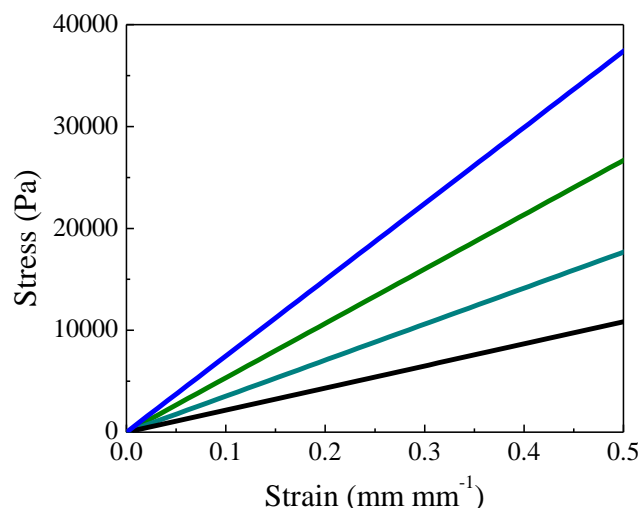


Figura 43: Gráficos de Fuerza vs. Deformación para matrices de inmovilización con y sin enzimas α -amilasa: PAAm-1 (---), PAAm-Amy-6 (---), PAAm-GO (---) y PAAm-GO-Amy-4 (---).

3.4.4.2. Análisis Mecánico Dinámico: Ensayos de Fatiga

Las pruebas de fatiga se realizaron para todos los materiales durante diez ciclos consecutivos de compresión/relajación con una rampa de fuerza lineal de 0,05 N a 1 N. Como criterio de análisis se tuvo en cuenta el número de ciclos hasta que la matriz pierde el 10 % de su elasticidad. Los resultados de la prueba de fatiga están relacionados con la tenacidad del material cuando se somete a fuerzas, tales como las palas de un agitador mecánico en el reactor. Los resultados se muestran en la Figura 44.

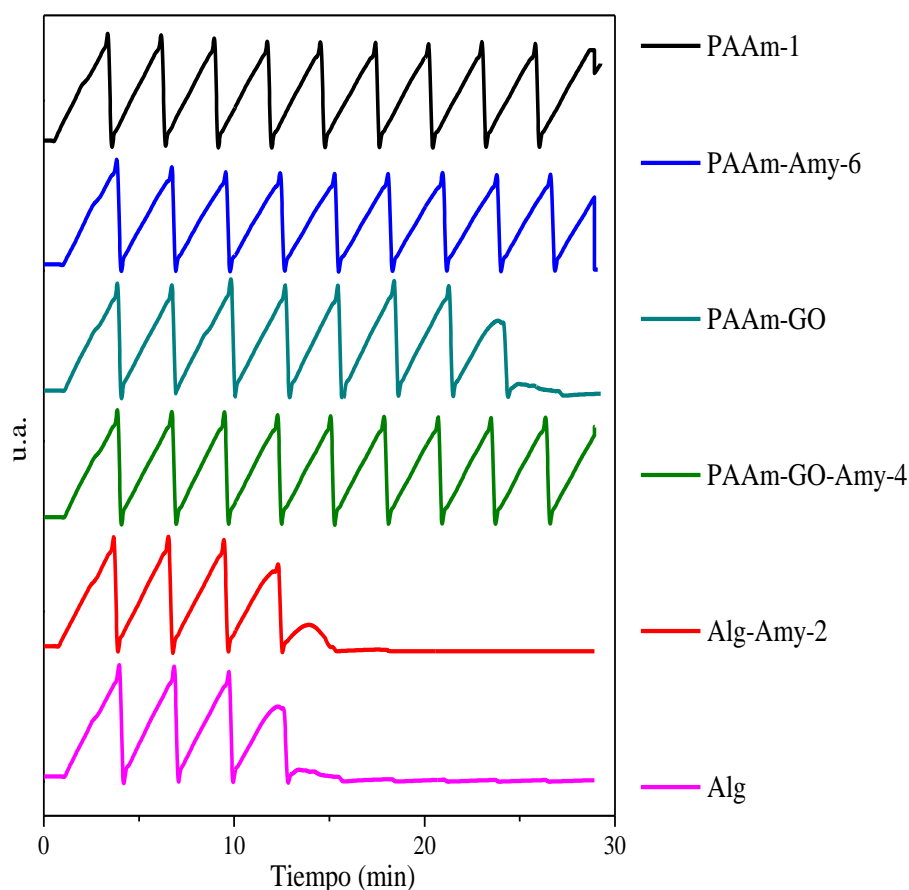


Figura 44: Ensayos de fatiga para matrices de inmovilización con/sin enzimas α -amilasa: PAAm-1 (---), PAAm-Amy-6 (---), PAAm-GO (---), PAAm-GO-Amy-4 (---), Alg-Amy-2 (---), Alg (---).

Los hidrogeles PAAm-1 manifiestan una alta tolerancia a la fatiga manteniendo su comportamiento elástico durante nueve ciclos de compresión/relajación, durante el décimo ciclo de fatiga e hidrogel comienza a perder elasticidad. En el caso de PAAm-Amy-6 también se evidencia alta tolerancia a la fatiga, si bien la pérdida de elasticidad en el noveno ciclo es más significativa que para PAAm. El PAAm-GO-Amy-4 mantiene su capacidad elástica durante los diez ciclos de fatiga, la incorporación de 5 % GO mejora significativamente la tenacidad del material, ya que para PAAm-GO la elasticidad disminuye considerablemente en el octavo ciclo. Todas las matrices de poliácridamida muestran mayor tolerancia a la fatiga que las matrices de alginato (Alg y Alg-Amy). Estos datos sugieren que los hidrogeles de poliácridamida tienen un límite de tracción más alto y constante en el tiempo que el Alg-Amy, y resultan en un material menos frágil y más tenaz.

Tabla 7: Propiedades mecánicas para matrices de inmovilización con y sin enzimas.

Materiales	Módulo elástico (kPa)	N° ciclos hasta 10 % pérdida elástica
PAAm-1	2,381 ± 0,550	10
PAAm-GO	12,850 ± 1,000	7
PAAm-Amy-6	5,776 ± 0,500	9
PAAm-GO-Amy-4	8,865 ± 0,500	10
Alg-Amy-2	155 ± 7,000 (*)	3

(*) (Stevens *et al.*, 2004)

3.4.5. Eficiencia de Inmovilización Enzimática

Se estudió la eficiencia de inmovilización de la enzima durante el proceso de preparación de PAAm-Amy, PAAm-GO-Amy y Alg-Amy, es decir, se determinó que tan eficientemente quedan retenidas las enzimas durante la polimerización de poliacrilamida y la formación de las perlas de alginato. La eficiencia de inmovilización fue determinada gravimétricamente utilizando una balanza analítica de $\pm 5 \times 10^{-5}$.

Como puede observarse en la Tabla 8 la inmovilización es altamente eficiente usando hidrogeles PAAm como matriz, lográndose retener más de un 97 % de las enzimas en todos los casos. Por otro lado, la encapsulación en perlas de alginato presenta una eficiencia de inmovilización baja (30 %). Aproximadamente el 60 % de la enzima originalmente presente en la solución de alginato se libera a la solución de CaCl_2 antes de la gelificación. Este resultado es relevante considerando que la enzima es uno de los insumos más costosos en el proceso de producción del bioetanol y minimizar las pérdidas en el procedimiento de inmovilización implica importantes ahorros económicos.

Los resultados expuestos muestran que el método propuesto resulta eficiente para la inmovilización del biocatalizador tanto para PAAm-Amy como PAAm-GO-Amy. Los resultados están de acuerdo con estudios anteriores de Zhang *et al* en los que los autores demostraron que las enzimas pueden inmovilizarse espontáneamente en GO. Probablemente, los grupos amina de las enzimas formen enlaces amida con los grupos carboxílicos de GO. Esta unión enzimática-GO covalente parece mejorar a pHs inferiores a 7,2 donde las láminas de GO están cargadas negativamente en solución acuosa. Alternativamente, los grupos amina podrían atacar nucleofílicamente los grupos quinona de GO. Aunque la eficiencia de inmovilización no

se altera significativamente con la incorporación de GO, el aumento del módulo de Young es ventajoso para mejorar las propiedades mecánicas del catalizador inmovilizado.

Tabla 8: Eficiencia de inmovilización para matrices con enzimas inmovilizadas.

Materiales	Eficiencia de inmovilización (%)
<i>PAAm-Amy-6</i>	98,0 ± 2.0
<i>PAAm-GO-Amy-4</i>	97,5 ± 1.5
<i>Alg-Amy-2</i>	30,5 ± 3.2

3.4.6. Capacidad de retención enzimática

3.4.6.1.1. Análisis mediante espectroscopía Uv-Visible

No sólo la eficiencia de inmovilización de la matriz es importante, sino también la capacidad de las matrices para retener las enzimas y para preservar la actividad enzimática durante un periodo de tiempo. El rendimiento de retención enzimática se ensayó mediante espectroscopia UV-visible a una absorbancia de 290 nm, donde se presenta una banda característica de soluciones enzimáticas.

La Figura 45 muestra el rendimiento de retención enzimático en función del tiempo. Luego de 120 min, Alg-Amy-2 reporta el rendimiento de retención más bajo correspondiente al 85 % de la carga inicial de la enzima y la curva de liberación alcanza una meseta a tiempos mayores. Por otro lado, para el mismo tiempo de análisis, PAAm-Amy-6 presenta un rendimiento de retención enzimática de 93 %, mientras que PAAm-GO-Amy-4 muestra un rendimiento del 98 %. Los resultados muestran que los hidrogeles covalentes logran retener más eficientemente a los biocatalizadores, en comparación con la matriz de alginato. Además, PAAm-GO-Amy-4 muestra la máxima retención enzimática (96 %). Este resultado indica la importancia del GO en la matriz que permite retener casi la totalidad de la enzima cargada en la matriz. La capacidad de adsorción de este nanomaterial ha sido demostrada en varios trabajos previos y los resultados aquí presentados están en total acuerdo con estos hallazgos. (Caykara *et al.*, 2006)

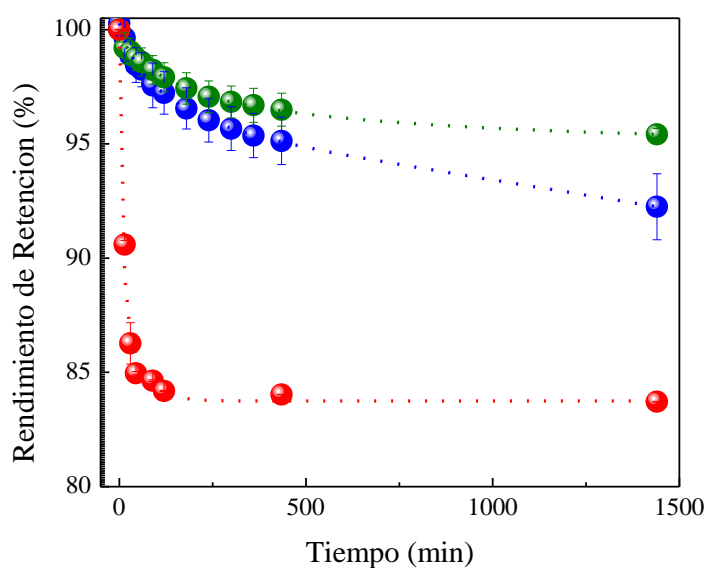


Figura 45: Rendimiento de retención enzimático para matrices de inmovilización con enzimas Alg-Amy-2 (●), PAAm-Amy-4 (●), PAAm-GO-Amy (●).

3.4.6.1.2. Análisis mediante Espectroscopía de Fluorescencia

El mantenimiento de la estructura cuaternaria de las enzimas α -amilasa liberadas de PAAm-Amy-6, PAAm-GO-Amy-4 y Alg-Amy-2 se analizaron siguiendo la señal de emisión característica de triptófano (THP) a 340 nm por espectroscopia de fluorescencia (Ver Figura 46).

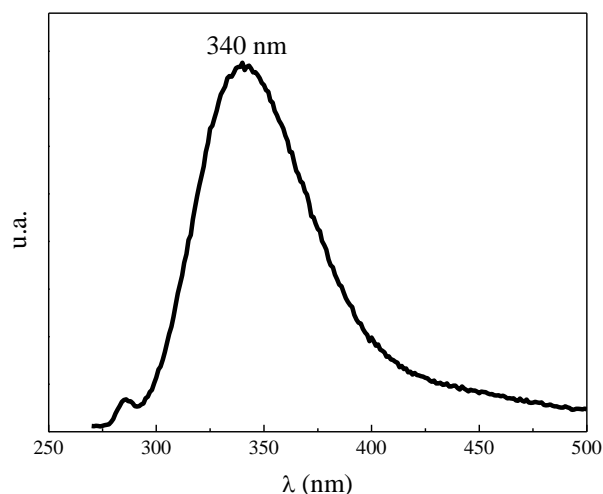


Figura 46: Espectro de emisión de fluorescencia de triptófano de α -amilasa.

La Figura 47 muestra la concentración de enzima liberada en solución acuosa medida durante 48 h. Los resultados muestran que la enzima mantiene su estructura cuaternaria después de atrapamiento para todas las matrices de inmovilización testeadas. Además, los valores de concentración de la enzima liberada están en total acuerdo con la prueba UV-visible y demuestran que la matriz de alginato no es eficaz para retener el biocatalizador, mientras que la PAAm-GO-Amy-4 es la mejor matriz para inmovilizar las enzimas.

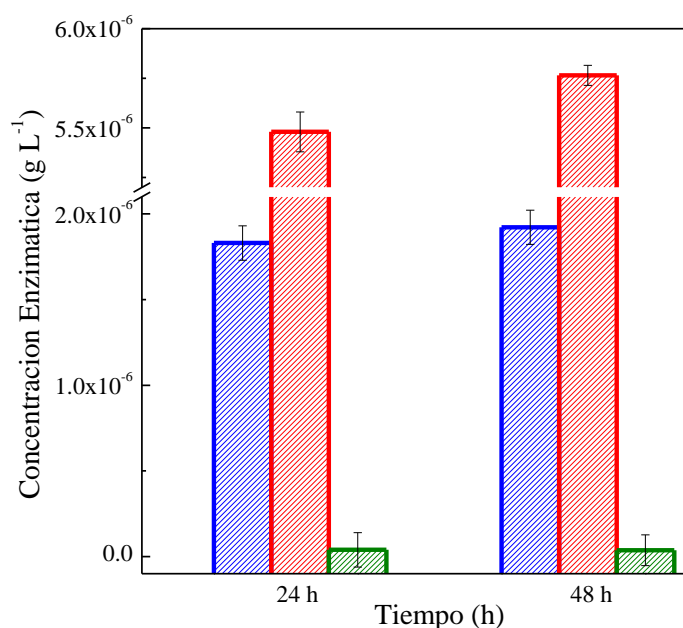


Figura 47: Rendimiento de retención enzimático para matrices de inmovilización con enzimas PAAm-Amy-6 (■), Alg-Amy-2 (■), (■) PAAm-GO-Amy-4.

3.4.7. Análisis mediante Espectroscopia FT-IR

Para caracterizar adicionalmente los materiales compuestos obtenidos, se llevaron a cabo estudios de FT-IR, los resultados se muestran en las Figura 48 a Figura 51. Por un lado, en el espectro FT-IR (Figura 48) del hidrogel (PAAm-1) es posible observar la banda ancha alrededor de 3400 cm^{-1} correspondiente al estiramiento simétrico de aminas alifáticas N-H. Además, las bandas en 2924 y 2853 cm^{-1} se asignan al estiramiento simétrico y antisimétrico de $-\text{CH}_3$. La banda a 1660 cm^{-1} se debe a la vibración de estiramiento $\text{C}=\text{O}$ de la banda de amida I. La banda de amida II que aparece a 1542 cm^{-1} se atribuye al movimiento de flexión N-H. Además, se presenta una banda de $\text{N}-\text{CH}_3$ (amidas) deformación simétrica en la zona de la huella dactilar (1390 cm^{-1}).

El espectro FT-IR de PAAm-GO (Figura 49) muestra dos picos característicos de las especies reducidas del GO a 1170 cm^{-1} y a 1050 cm^{-1} . Como era de esperar, los espectros de PAAm-GO muestran también las bandas típicas del hidrogel.

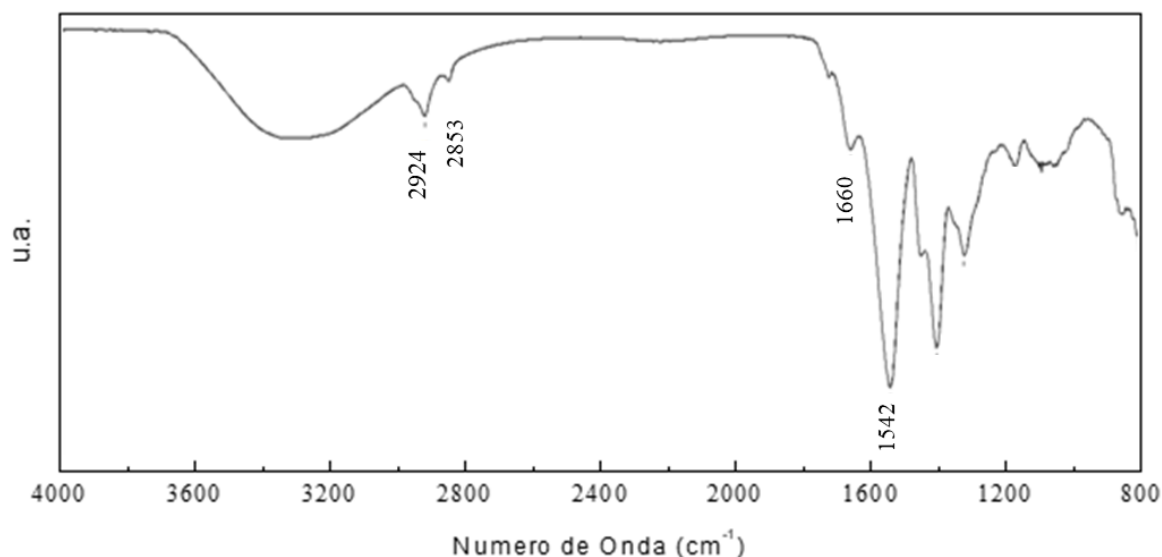


Figura 48: Espectro FT-IR de hidrogel de poliacrilamida PAAm-1

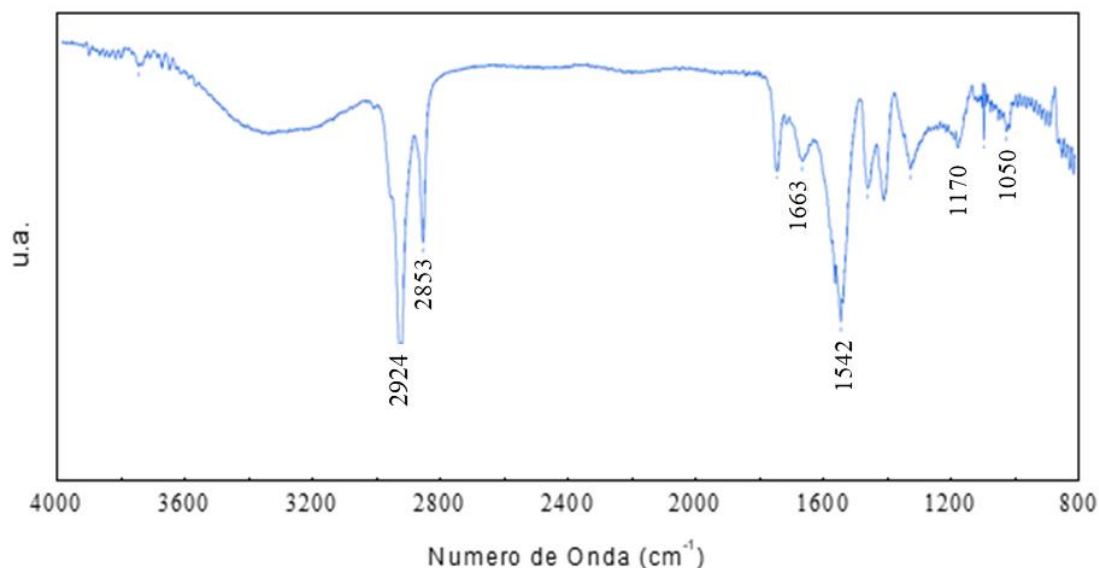


Figura 49: Espectro FT-IR de hidrogel de poliacrilamida con óxido de grafeno PAAm-GO.

La incorporación de las enzimas a cada matriz produce bandas más anchas y poco definidas en la región de la huella dactilar ($700 - 1500\text{ cm}^{-1}$). Sin embargo, se mantienen

las bandas características del hidrogel a alta energía, la banda ancha de estiramiento de N-H (3400 cm^{-1}) y las dos bandas de estiramiento simétrico y antisimétrico del $-\text{CH}_3$ ($2900\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$) como se muestra en las Figura 51.

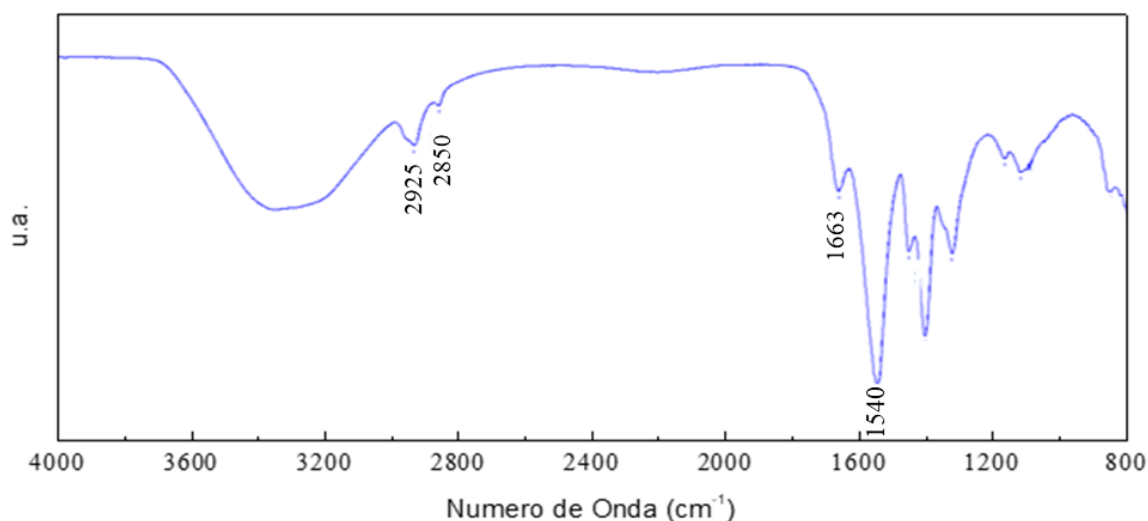


Figura 50: Espectro FT-IR de hidrogel de poliacrilamida PAAm-Amy-6.

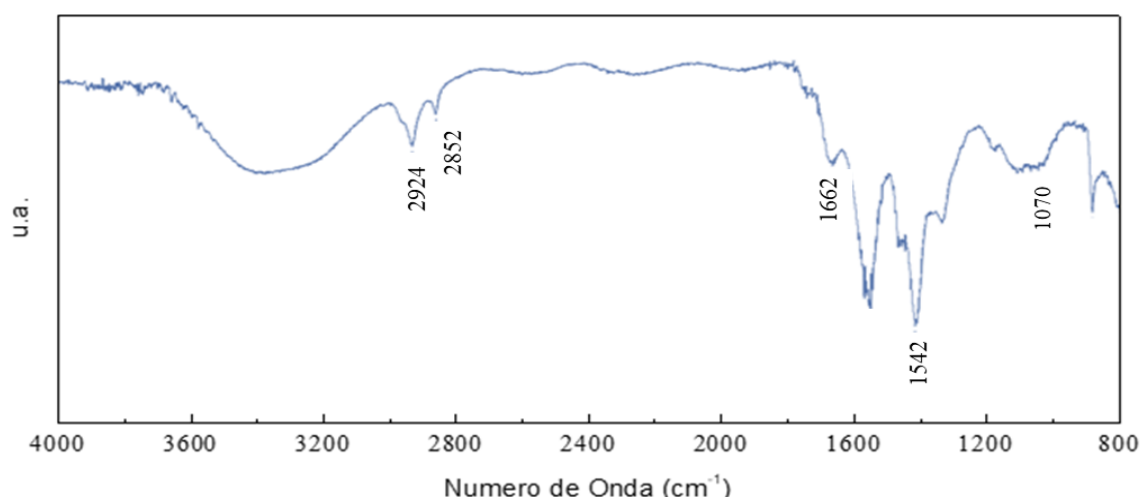


Figura 51: Espectro FT-IR de hidrogel de poliacrilamida PAAm-GO-Amy-4.

3.4.8. Cinética Enzimática de α -amilasa

3.4.8.1. Estudios Cinéticos de la Reacción de Hidrólisis

Los estudios cinéticos de la reacción de hidrólisis provocada por las enzimas libres e inmovilizadas constituyeron el primer paso en la búsqueda de la compresión y análisis de estos sistemas. Se utilizaron 20 μL de enzima α -amilasa, dos cápsulas PAAm-Amy-6 o PAAm-GO-Amy-4 y cinco perlas Alg-Amy-2 para cada caso, respectivamente. Por lo tanto, la cantidad de

enzima *Novozyme* inicialmente incorporada en cada sistema es la misma, lo que posibilita la comparación de los tres sistemas. Para la construcción de la curva de calibración (Figura 52) se utilizó una solución patrón de glucosa (glucosa monohidratada, Cicarelli) 3% p/v a partir de la cual se realizaron las diluciones sucesivas.

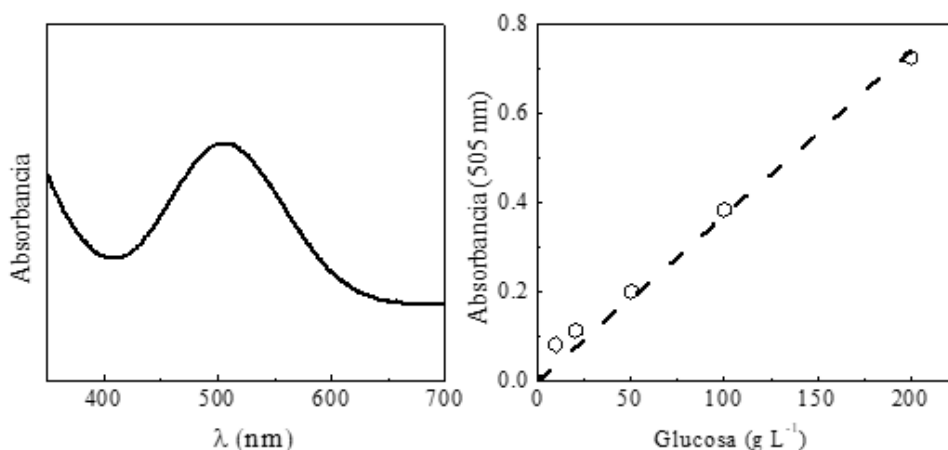


Figura 52: Curva de calibración para concentración de glucosa a 505 nm.

Las Figura 53, Figura 54, Figura 55 y Figura 56 representan la evolución temporal de la reacción en función del consumo de sustrato para Free-Amy, PAAm-Amy, PAAm-GO-Amy y Alg-Amy respectivamente. En cada figura se muestra el consumo de cuatro cantidades iniciales diferentes de sustrato. Las experiencias se realizaron por triplicado y en cada caso el resultado obtenido corresponde a un promedio aritmético de las tres mediciones. En todos los casos los hidrogeles y las perlas de alginato fueron previamente hidratados hasta el equilibrio.

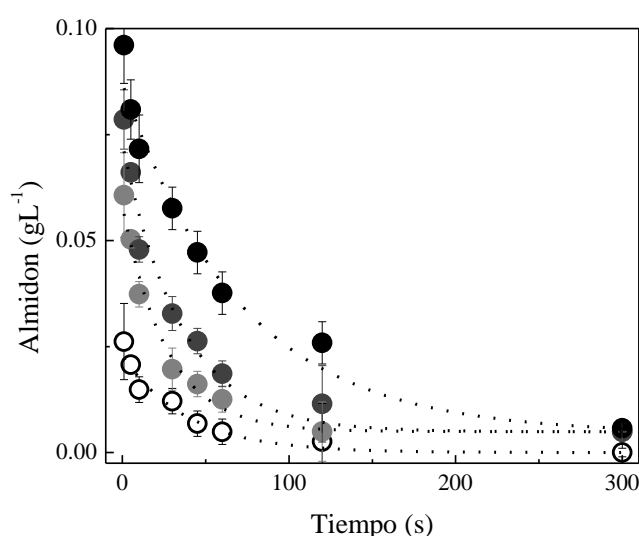


Figura 53: Cinética enzimática de Free-Amy durante la reacción de hidrólisis para diferentes concentraciones iniciales de almidón. (○) 0,02 g L⁻¹, (◐) 0,05 g L⁻¹, (●) 0,07 g L⁻¹ (●•) 0,1 g L⁻¹.

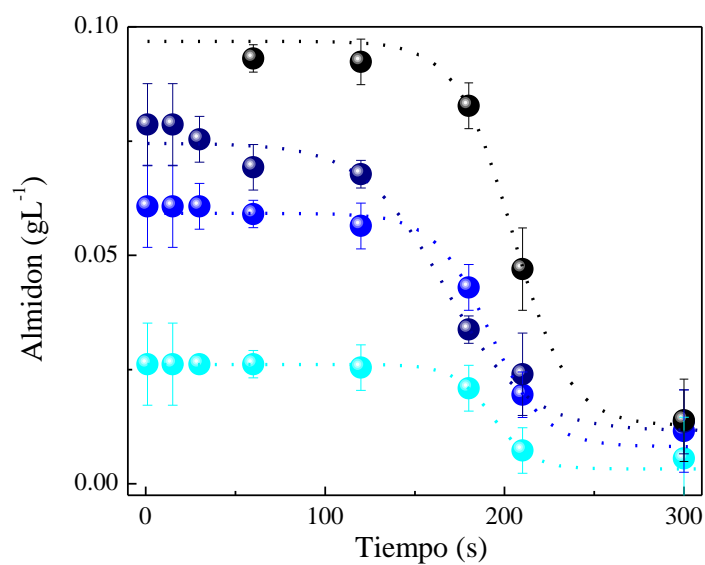


Figura 54: Cinética enzimática de PAAm-Amy-6 durante la reacción de hidrólisis de almidón. para diferentes concentraciones iniciales de almidón. (●) 0,02 g L⁻¹, (●) 0,05 g L⁻¹, (●) 0,07 g L⁻¹ (●) 0,10 g L⁻¹.

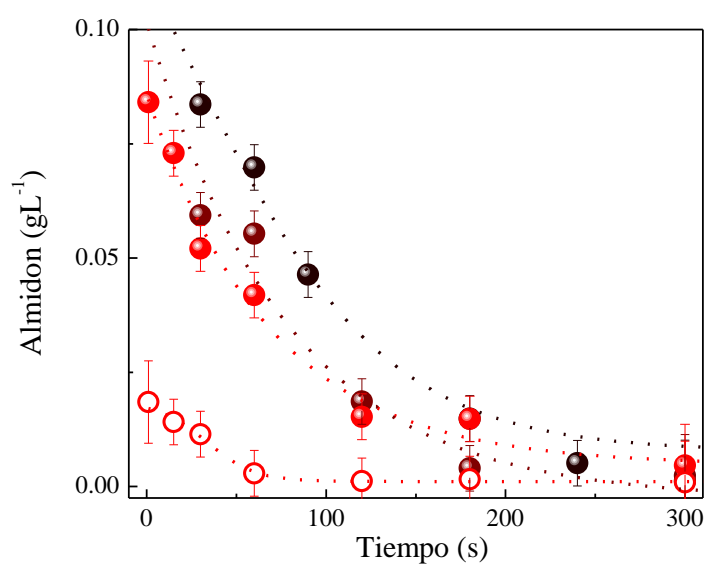


Figura 55: Cinética enzimática de Alg-Amy-2 durante la reacción de hidrólisis de almidón para diferentes concentraciones iniciales de almidón. (○) 0,02 g L⁻¹, (●) 0,05 g L⁻¹, (●) 0,07 g L⁻¹ (●) 0,10 g L⁻¹.

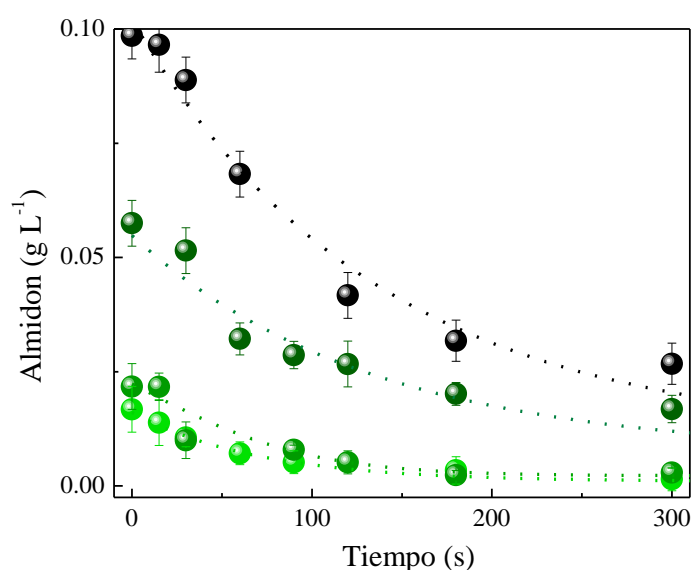


Figura 56: Cinética enzimática de PAAm-GO-Amy-4 durante la reacción de hidrólisis de almidón para diferentes concentraciones iniciales de almidón. (●) 0,02 g L⁻¹, (●) 0,05 g L⁻¹, (●) 0,07 g L⁻¹ (●) 0,10 g L⁻¹.

Tanto las enzimas libres como inmovilizadas muestran la tendencia de decrecimiento exponencial típico de Michaelis-Menten. Respecto a las enzimas inmovilizadas PAAm-Am-6, se observa una fase estacionaria bastante notable, que retarda ligeramente el inicio de la reacción. Esta fase no se presenta para la matriz de perlas de alginato ni para PAAm-GO-Amy-4 que presenta una tendencia similar a la Free-Amy.

Analizando, para todos los casos la concentración inicial de almidón de 0,100 g L⁻¹, a 300 s de reacción, la totalidad de almidón fue hidrolizado por Free-Amy ($0,00172 \pm 0,007$ g L⁻¹), mientras que Alg-Amy-2 hidrolizó el 98 % del almidón inicial ($0,00330 \pm 0,009$ g L⁻¹), PAAm-Amy-6 el 87 % ($0,01391 \pm 0,009$ g L⁻¹) y PAAm-GO-Amy-4 hidrolizó el 96% ($0,0418 \pm 0,009$ g L⁻¹). La disminución del porcentaje de hidrólisis puede deberse al retardo difusional provocado por la inmovilización de las enzimas en matrices de naturaleza compacta, lo que lentifica la velocidad de reacción inicial pero también impide o demora la fuga del catalizador desde el interior de la matriz al seno de la solución.

El rendimiento de liberación enzimática mayor de PAAm-GO-Amy-4 comparado con PAAm-Amy-6 podría indicar que las enzimas son retenidas más eficientemente por la interacción con GO lo que aumenta sus posibilidades de reutilización en ciclos sucesivos de hidrólisis. Estos resultados sugieren que el impedimento de la difusión, tendencia contrarrestada en los geles de poliacrilamida por la adición de GO.

3.4.8.2. Parámetros Cinéticos de Michaelis-Menten

3.4.8.2.1. Método de aproximación I: Linealización de Lineweaver-Burk

La Figura 57 muestra la linealización de los datos de hidrólisis del almidón utilizando el método Lineweaver-Burk para enzimas libres e inmovilizadas, de acuerdo a la **Ecuación 9**. Los datos cinéticos de los parámetros de Michaelis-Menten se presentan en la Tabla 9. La tasa máxima de degradación del almidón corresponde a hidrólisis por enzimas libres. Para enzimas inmovilizadas, la velocidad de degradación más alta fue obtenida por Alg-Amy, mientras que la velocidad de degradación de PAAM-Amy y PAAM-GO-Amy resultaron de $0,0011 \text{ g L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $0,0013 \text{ g L}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente.

Respecto a los valores obtenidos para las constantes de Michaelis-Menten, se esperaban valores idénticos para todos los casos, debido a que se hizo reaccionar la misma enzima y el mismo sustrato en idénticas condiciones. Las diferencias en los valores de K_m obtenidos (Ver Figura 57) podría ser indicativo de la presencia de factores de inhibición, sugiriendo que la matriz podría actuar como un inhibidor físico de la reacción enzimática compitiendo con el sustrato por los sitios activos de la enzima y, consecuentemente, modificando los parámetros cinéticos. (Thatipamala *et al.*, 1992)

Para el análisis comparativo, el Free-Amy se considerará como la situación de no inhibición. En los casos de Free-Amy y Alg-Amy existe una inhibición no competitiva que se evidencia en la disminución de v_{max} , para el caso inhibido (Alg-Amy), mientras que K_m resulta no afectada. Los casos PAAM-Amy y PAAM-GO-Amy presentan una inhibición no competitiva en comparación con la Free-Amy que resulta en una disminución de v_{max} y K_m , posiblemente debido a que los sitios activos están bloqueados por la red de hidrogel.

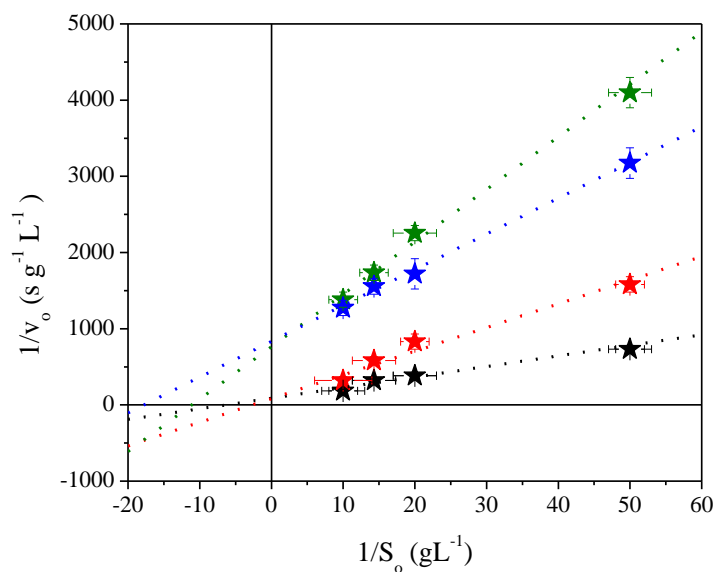


Figura 57: Regresión lineal de la ecuación de Michaelis-Menten por el método Lineweaver-Burk para Free-Amy (★), Alg-Amy-2 (★), PAAm-Amy-6 (★), PAAm-GO-Amy-4 (★).

Tabla 9: Parámetros cinéticos de Michaelis-Menten obtenidos mediante Lineweaver-Burk para enzimas libres e inmovilizadas. Concentración enzimática: $2,96 \times 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$.

Material	V_{\max} , g (L.s)^{-1} (*)	K_m , g L^{-1} (**)	Actividad enzimática, g (g.min)^{-1}	R^2
Free-Amy	0,0096	0,1227	1,9459	0,998
PAAm-Amy-6	0,0011	0,0560	0,2230	0,996
Alg-Amy-2	0,0076	0,2281	1,5405	0,966
PAAm-GO-Amy-4	0,0013	0,0839	0,2635	0,996

(*) ± 0.005 (**) ± 0.008

En relación a la actividad enzimática, la bibliografía consultada (Hagberg, 1960; Rohleder *et al.*, 2004) predice un amplio rango de actividades enzimáticas que depende de las condiciones de la enzima previas a la reacción, tales como estabilidad de almacenamiento, envejecimiento natural, envenenamiento, entre otros; y a las condiciones de la reacción, principalmente, temperatura, pH y porcentaje de almidón hidrolizable presente en el sustrato. (González *et al.*, 2004; Abreu y Fariai, 2007) Los valores sugeridos para α -amilasa de *Candida utilis* por Sigma-Aldrich son de 250 - 800 U.A., lo que corresponde a $0,789\text{-}1,8661 \text{ g (g.min)}^{-1}$.

3.4.8.2.2. Método de aproximación II: Ajuste No Lineal

La Figura 58 muestra el ajuste de los datos de hidrólisis del almidón por un método de regresión no lineal de acuerdo a la Ecuación 8 para enzimas libres e inmovilizadas. Los datos cinéticos de los parámetros de Michaelis-Menten se presentan en la Tabla 10. Este método de regresión hace un ajuste más preciso de los datos experimentales, pero no permite analizar comportamientos ni hacer comparaciones entre estas.

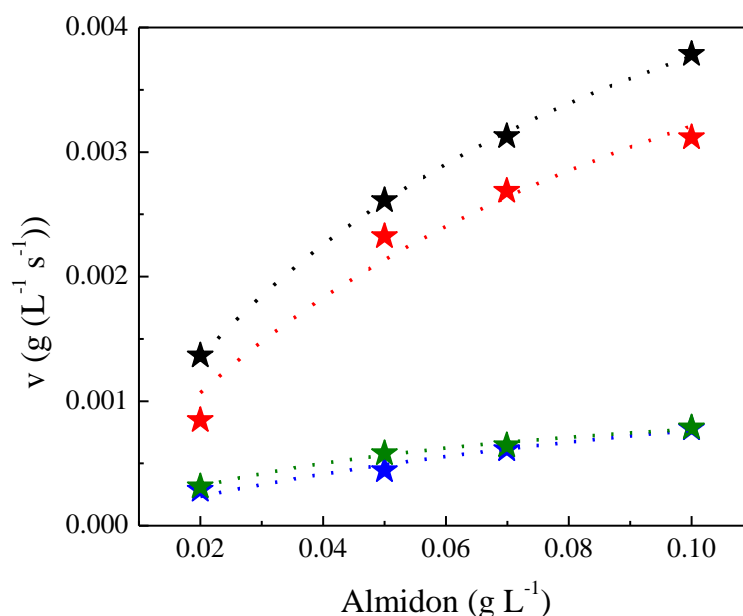


Figura 58: Regresión no lineal de la ecuación de Michaelis-Menten para Free-Amy (★), Alg-Amy (★), PAAm-Amy (★), PAAm-GO-Amy (★).

Tabla 10: Parámetros cinéticos de Michaelis-Menten obtenidos mediante regresión no lineal para enzimas libres e inmovilizadas. Concentración enzimática: $2,96 \times 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$.

Material	V_{\max} , $\text{g (L.s)}^{-1} (*)$	K_m , $\text{g L}^{-1} (**)$	Actividad enzimática, g (g.min)^{-1}	R^2
Free-Amy	0,0064	0,1008	1,2973	0,955
PAAm-Amy-6	0,0010	0,0808	0,2027	0,945
Alg-Amy-2	0,0068	0,1300	1,3784	0,999
PAAm-GO-Amy-4	0,0012	0,0600	0,2432	0,989

Las máximas velocidades obtenidas para cada caso se condicen con las obtenidas para regresión lineal, las velocidades de degradación más altas son las obtenidas por Free-Amy y Alg-Amy-2. Para enzimas inmovilizadas en matrices de poliacrilamida, la velocidad de

degradación resultó de $0.0010 \text{ g L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $0.0012 \text{ g L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para PAAm-Amy-6 y PAAm-GO-Amy-4 respectivamente. También en este caso se observan diferencias entre los valores obtenidos para las constantes de Michaelis-Menten. Nuevamente, esto parecería indicar la presencia de factores de inhibición.

3.4.8.3. Cinética de Reusabilidad del Sistema Enzimático con α -amilasa

Después del primer ciclo de hidrólisis, se estudió la reutilización enzimática durante diez ciclos consecutivos para PAAm-Amy-6 y PAAm-GO-Amy-4 y tres ciclos para Alg-Amy-2 (ya que posteriormente se observó una reducción de la actividad enzimática de más del 70 %). Las enzimas libres no muestran actividad después del primer ciclo de reacción, y por lo tanto no pueden ser reutilizadas. Los datos de consumo de sustrato en función del tiempo para los cinco primeros ciclos se muestran en las Figura 59, Figura 60 y Figura 61, para Alg-Amy-2, PAAm-Amy-6 y PAAm-GO-Amy-4, respectivamente. La Tabla 11 presenta los valores de almidón residual para todos los ciclos de reacción estudiados.

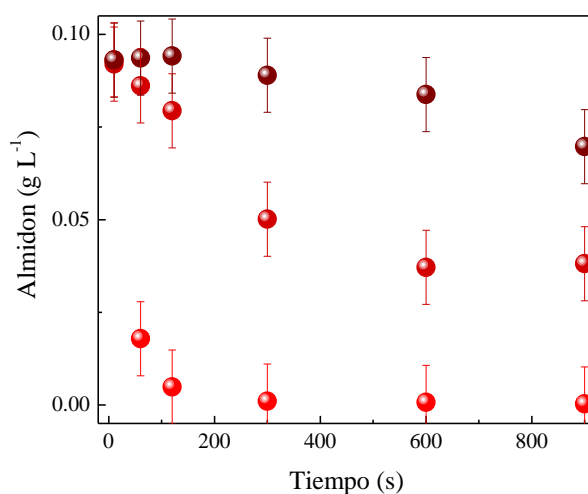


Figura 59: Reutilización enzimática de Alg-Amy-2 para la hidrólisis del almidón. Concentración inicial de almidón de $0,100 \pm 0,005 \text{ g L}^{-1}$ (●) Ciclo 1, (●) Ciclo 2, (●) Ciclo 3.

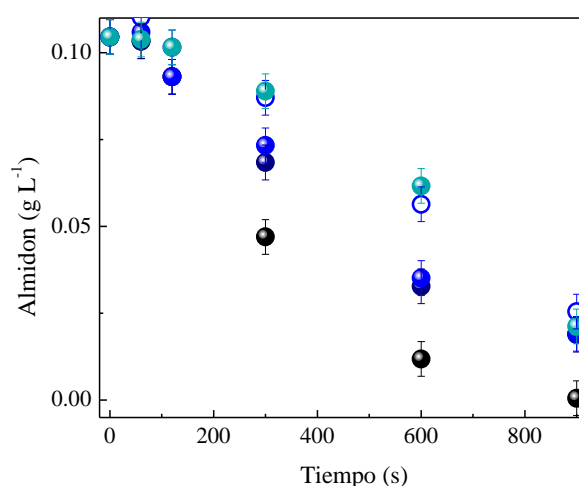


Figura 60: Reutilización de PAAm-Amy-6 para la hidrólisis del almidón. Concentración inicial de almidón de $0,100 \pm 0,005 \text{ g L}^{-1}$ (●) Ciclo 1, (○) Ciclo 2, (●) Ciclo 3, (●) Ciclo 4, (●) Ciclo 5.

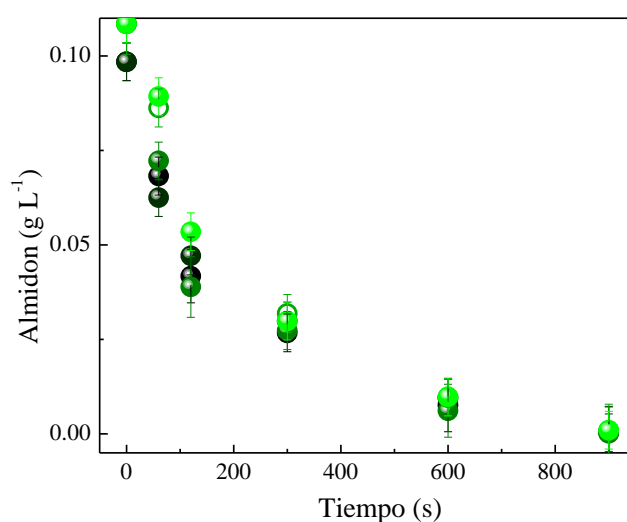


Figura 61: Reutilización de PAAm-GO-Amy para la hidrólisis del almidón. Concentración inicial de almidón de $0,100 \pm 0,005 \text{ g L}^{-1}$ (●) Ciclo 1, (○) Ciclo 2, (●) Ciclo 3, (●) Ciclo 4, (●) Ciclo 5.

Los resultados experimentales muestran una notable ventaja de reutilización para enzimas inmovilizadas en hidrogeles PAAm-Amy-6 en comparación con Alg-Amy-2 inmovilizado. La alta tasa de degradación observada (ver Tabla 11) para Alg-Amy-2 durante el primer ciclo de reacción indica que las cápsulas de alginato no soportan el régimen de agitación ni la turbulencia requerida para el sistema y consecuentemente colapsan o se rompen durante el primer ciclo de reacción. Por lo tanto, las enzimas Alg-

Amy-2 estarían actuando de manera similar a la liberación de α -amilasa en solución, dejando las matrices vacías de contenido enzimático después del tercer ciclo de reutilización.

La reutilización de PAAm-Amy-6 mejora sustancialmente, pero se observa que la velocidad de hidrólisis disminuye con el número de ciclos. Mientras que, con la incorporación de GO a la matriz PAAm (PAAm-GO-Amy-4) la velocidad de hidrólisis resulta casi tan alta como para el primer ciclo Alg-Amy-2, el almidón se consume por completo y su comportamiento se mantiene constante durante todos los ciclos sucesivos. Evidentemente, la presencia de GO mejora notablemente las propiedades mecánicas de la matriz y la capacidad de reutilización, logrando hasta diez ciclos reutilizados de reacción con la concentración de almidón residual más baja.

Tabla 11: Cinética de la reusabilidad enzimática durante la reacción de hidrólisis de almidón [S]. Concentración inicial de almidón de 0,146 g L⁻¹.

	Free-Amy		PAAm-Amy		Alg-Amy		PAAm-GO-Amy	
<i>Ciclo</i>	[S] residual	% [S] consumido	[S] residual	% [S] consumido	[S] residual	% [S] consumido	[S] residual	% [S] consumido
<i>Inicial</i>	0,00076	0	0,0005	99	0,0003	100	0,0000	100
<i>1</i>	- (*)	-	0,0182	83	0,0381	59	0,0165	88
<i>2</i>	-	-	0,0191	82	0,0697	25	0,0091	94
<i>3</i>	-	-	0,0255	76	-	-	s/d	-
<i>4</i>	-	-	0,0212	80	-	-	0,0192	68
<i>5</i>	-	-	0,0213	80	-	-	0,0222	85
<i>6</i>	-	-	0,0212	80	-	-	s/d	-
<i>7</i>	-	-	0,0233	78	-	-	0,0212	85
<i>8</i>	-	-	0,0255	76	-	-	0,0248	83
<i>9</i>	-	-	0,0422	60	-	-	0,0342	77

(*) Los datos (-) corresponden a ciclos de reacción con porcentajes de almidón consumido inferiores al 30 %.

3.4.9. Cinética Enzimática de β -amilasa

3.4.9.1. Estudios Cinéticos de la Reacción de Sacarificación

Los estudios cinéticos de la reacción de sacarificación fueron realizados para enzimas β -amilasas libres e inmovilizadas en hidrogeles. A continuación, en las Figura 62 a Figura 65, se presentan los resultados obtenidos. El procedimiento de ensayo y medición fue similar al realizado para enzimas α -amilasa. Se utilizaron 20 μ L de enzima β -amilasa o dos unidades de PAAm-Gmy, de forma tal que la cantidad de enzima inicial incorporada en cada sistema sea la misma.

La Figura 62 representa la evolución temporal de la reacción en función del consumo de sustrato para cuatro cantidades iniciales diferentes de sustrato y enzima β -amilasa libre y la Figura 63 muestra la linealización de los datos iniciales para cada caso (concentración inicial de sustrato) presentado en el primer gráfico citado. Las experiencias se realizaron por triplicado y en cada caso el resultado obtenido corresponde a un promedio aritmético de las tres mediciones. Los hidrogeles utilizados se encontraban hidratados en hinchamiento de equilibrio.

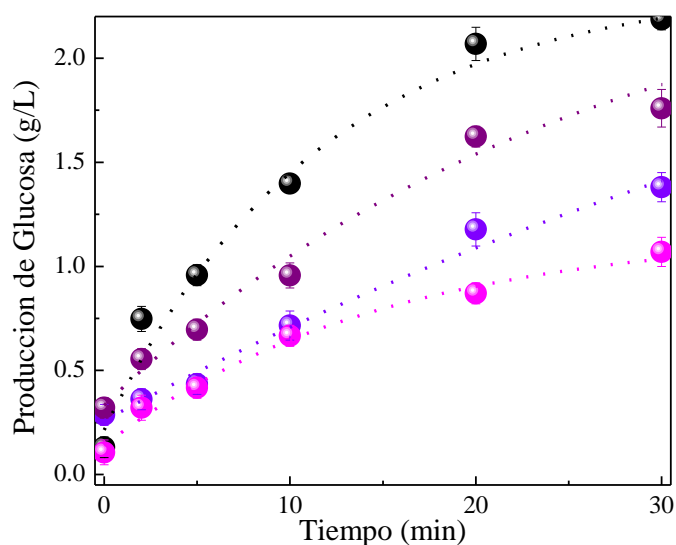


Figura 62: Cinética enzimática para β -amilasa libre reacción de sacarificación, previa reacción de hidrólisis en función de la producción de glucosa para diferentes concentraciones iniciales de almidón. (●) 5 (●) 2 (●) 1 (●) 0,5 g L⁻¹.

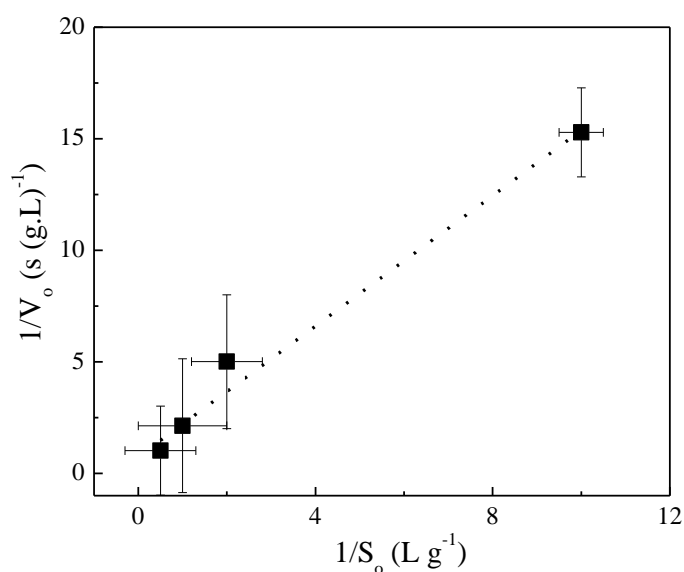


Figura 63: Cinética enzimática para β -amilasa libre. Linealización de los parámetros cinéticos iniciales de acuerdo al método de Lineweaver-Burk.

Idénticos ensayos se realizaron para enzima β -amilasa inmovilizada PAAm-Gmy y los resultados se muestran en la Figura 64 y la Figura 65. Las experiencias se realizaron por triplicado con hidrogeles en estado hinchado y en cada caso el resultado obtenido corresponde a un promedio aritmético de las tres mediciones.

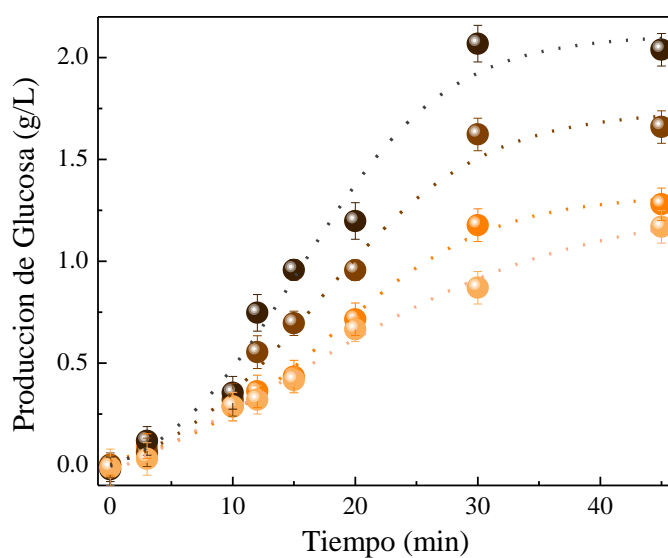


Figura 64: Evolución temporal de la reacción de sacarificación para PAAm-Gmy-3, para diferentes concentraciones iniciales de almidón: (●) 0,5 (●) 1 (●) 2 (●) 5 g L⁻¹.

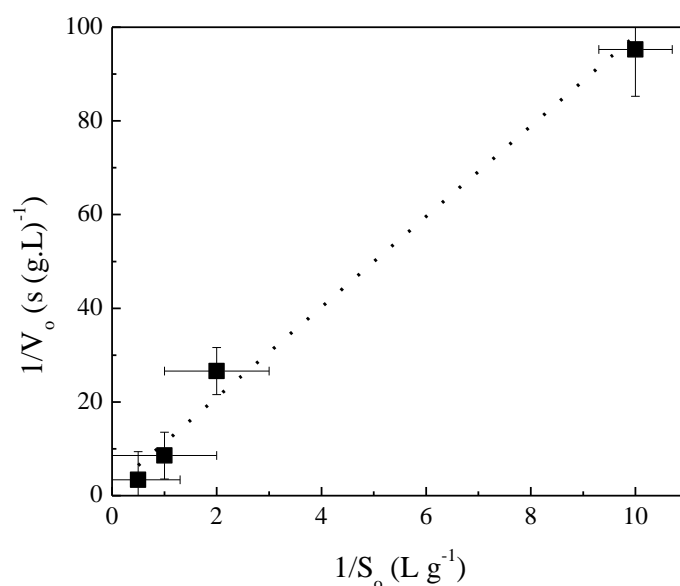


Figura 65: Linealización de los parámetros cinéticos de PAAm-Gmy-3 en la reacción de sacarificación.

Los resultados experimentales muestran que enzimas libres catalizan la reacción a mayor velocidad respecto a enzimas inmovilizadas. Como contrapartida, no disminuyen su actividad luego de tres ciclos de reacción consecutivos. A partir de los estudios cinéticos obtenidos y siguiendo los mismos lineamientos que para el caso de enzima α -amilasa se determinaron los parámetros de Michaelis-Menten, los que se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12: Parámetros cinéticos de Michaelis-Menten para enzimas β -amilasas libres e inmovilizadas en hidrogeles de poliacrilamida.

Material	V_{\max} , g (L.s) ⁻¹	K_m , g L ⁻¹	R^2
Free-Gmy	7,278	6,394	0,986
PAAm-Gmy-3	0,654	6,189	0,959

La máxima velocidad de degradación de glucosa corresponde a 7,278 g (L.s)⁻¹ y se obtiene mediante sacarificación de enzimas libres. La velocidad máxima de PAAm-Gly fue de 0,654 g (L.s)⁻¹, lo que corresponde aproximadamente a un décimo del valor obtenido para enzimas libres. Si bien este resultado puede resultar negativo para el sistema inmovilizado, al analizar los tiempos globales de operación y teniendo en cuenta que la reacción de

sacarificación sólo representa un 2 % del tiempo total de la reacción, la baja velocidad de reacción enzimática no resulta tan perjudicial.

La constante de velocidad k_m presenta valores similares en ambos casos, ya que se trata de la misma enzima y el mismo sustrato, bajo idénticas condiciones de reacción; pequeñas discrepancias entre los valores alcanzados pueden deberse a errores experimentales aleatorios, ya que se trata de un sistema biológico complejo de baja reproducibilidad.

3.4.9.2. Cinética de la Reusabilidad Enzimática (β -amilasa)

La reusabilidad enzimática de β -amilasa se estudió durante tres ciclos consecutivos de 45 min cada uno para enzimas libres e inmovilizadas PAAm-Gmy-3. Los resultados obtenidos se observan en la Figura 66, donde se presentan los resultados obtenidos para enzimas libres e inmovilizadas respectivamente. La reusabilidad enzimática para enzimas β -amilasa inmovilizadas en hidrogeles fue comprobada para tres ciclos de reacción en los cuales la actividad enzimática se mantuvo prácticamente constante. Si bien, sólo se probó para tres ciclos de reacción, evidencia experimental previa presentada en este informe, podría indicar que esta tendencia se extiende hasta al menos cinco ciclos de reacción. Actualmente, se están realizando experiencias para confirmar esta hipótesis.

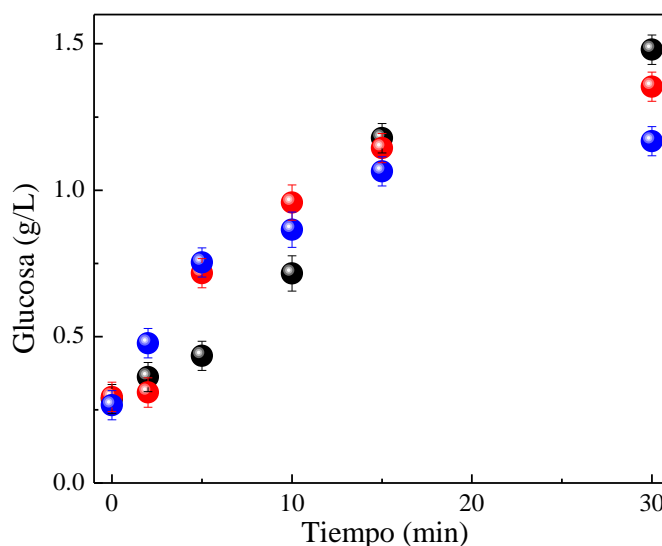


Figura 66: Reusabilidad enzimática para β -amilasa libre para reacción de sacarificación. Evolución temporal de la reacción de sacarificación en función de la producción de glucosa para concentraciones inicial de almidón $0,146 \text{ g L}^{-1}$. (●) Ciclo 1, (●) Ciclo 2, (●) Ciclo 3.

3.5. Conclusiones Parciales

Hidrogeles de poliacrilamida ofrecen múltiples posibilidades al implementarse como matrices de inmovilización para enzimas y levaduras involucradas en la producción de bioetanol. El particular carácter monolítico y macroporoso de estos hidrogeles los hace especialmente adecuados para salvar tres dificultades, frente a otras matrices de inmovilización (perlas de alginato): la facilidad de reutilización, la mayor tolerancia a condiciones medioambientales adversas y el atrapamiento del componente activo durante un periodo prolongado de tiempo. Se confirmó además por espectroscopia de fluorescencia que la estructura conformacional cuaternaria de las proteínas no se alteró durante el procedimiento de encapsulación.

Además, se demostró que la incorporación de GO a PAAm contribuye a mantener la enzima inmovilizada, a potenciar las propiedades mecánicas y a disminuir la fuga enzimática en comparación con una matriz clásica de inmovilización (alginato). Asimismo, se encontró que el rendimiento catalítico de las enzimas inmovilizadas no se ve afectado significativamente por la matriz de inmovilización a lo largo del tiempo de reacción.

Respecto a la cinética de reacciones enzimáticas utilizando catalizadores libres e inmovilizados, se determinaron los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten. Los valores de actividad enzimática, durante la reacción de hidrólisis, pronostican una reacción tres veces más lenta para α -amilasa inmovilizada en hidrogeles respecto a la enzima libre. Sin embargo, en cuanto a tiempos absolutos, esta disminución de velocidades no afecta el tiempo de operación del proceso global. Asimismo, la posibilidad de reutilización marca una importante ventaja al momento de operar con enzimas inmovilizadas en hidrogeles, ya que luego de cinco ciclos de reacción las enzimas continuaban activas y luego de diez ciclos de reutilización las enzimas α -amilasas experimentaron una disminución de actividad sólo de un 25-30 %. En contraste, la inmovilización de enzimas en alginato de sodio arrojó resultados de velocidad máxima de reacción cercanos a los de enzimas libres, pero la baja a nula posibilidad de reutilización y las inadecuadas propiedades mecánicas de estos materiales los hacen poco apropiados para ser implementados en la producción de etanol.

4. Levaduras Inmovilizadas

4.1. Introducción y Antecedentes

4.1.1. Levaduras *Saccharomyces cerevisiae*

Se denomina levadura a cualquiera de los diversos hongos microscópicos unicelulares capaces de realizar descomposición mediante fermentación de polímeros orgánicos, generalmente azúcares o hidratos de carbono, produciendo sustancias químicas más simples. (Carrillo *et al.*, 2007) Las levaduras suelen estar unidas entre sí formando colonias. Entre sus características principales se destacan su facilidad de cultivo y su alta velocidad de división celular. Una de las levaduras más conocidas es la especie *Saccharomyces cerevisiae* (del griego: *Saccharo*: azúcar, *myces*: hongo y *cerevisiae*: cerveza). (Department of Genetics, 2014) Esta levadura tiene la facultad de crecer en forma anaeróbica realizando fermentación alcohólica. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) es un hongo ascomiceto que ha sido ampliamente estudiado dada su importancia en la industria panadera y vitivinícola, así como por su capacidad de producir etanol. Por esta razón, se emplea en muchos procesos de fermentación industrial. (Zumbado Rivera *et al.*, 2006)

Existen 2 tipos de fermentaciones: alcohólica y láctica. (Pronk *et al.*, 1996) La fermentación alcohólica es un proceso biológico en ausencia de oxígeno originado por la actividad microbiana de levaduras y bacterias que procesan azúcares (carbohidratos) como glucosa, sacarosa, fructosa, entre otros; si bien estos azúcares son susceptibles a degradarse gracias a la producción intrínseca de enzimas, lo hacen muy lentamente. Los productos finales (Figura 67), previa reacción de glucólisis, que se obtienen de este proceso son etanol (producto principal), dióxido de carbono, metanol, ácido láctico y ácido acético (trazas). (Bott, 2014)

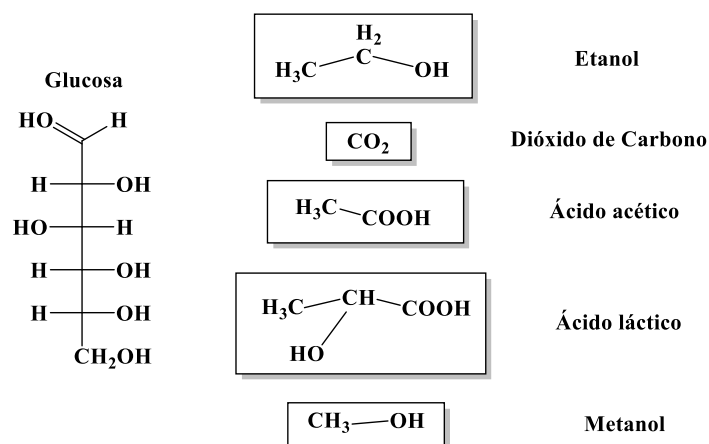


Figura 67: Productos de fermentación alcohólica de glucosa por acción de *S. cerevisiae*.

La glucólisis, es la ruta catabólica del microorganismo encargada de oxidar la glucosa con la finalidad de obtener energía para la célula. Consiste en diez reacciones enzimáticas consecutivas que convierten a la glucosa en dos moléculas de piruvato, el cual es capaz de seguir varias vías metabólicas, entre ellas la de la fermentación alcohólica, para así continuar entregando energía al organismo. (Boronat Gil *et al.*, 2011) Como se indica en el esquema de reacciones de la Figura 68, la fermentación alcohólica produce muy poca energía neta, sólo dos moléculas de ATP por cada molécula de piruvato obtenido de la glucólisis. Básicamente, el proceso de fermentación se lleva a cabo cuando estas levaduras, se encuentran en un medio libre de oxígeno y rico en azúcares hexosas (glucosa). (Pronk *et al.*, 1996)

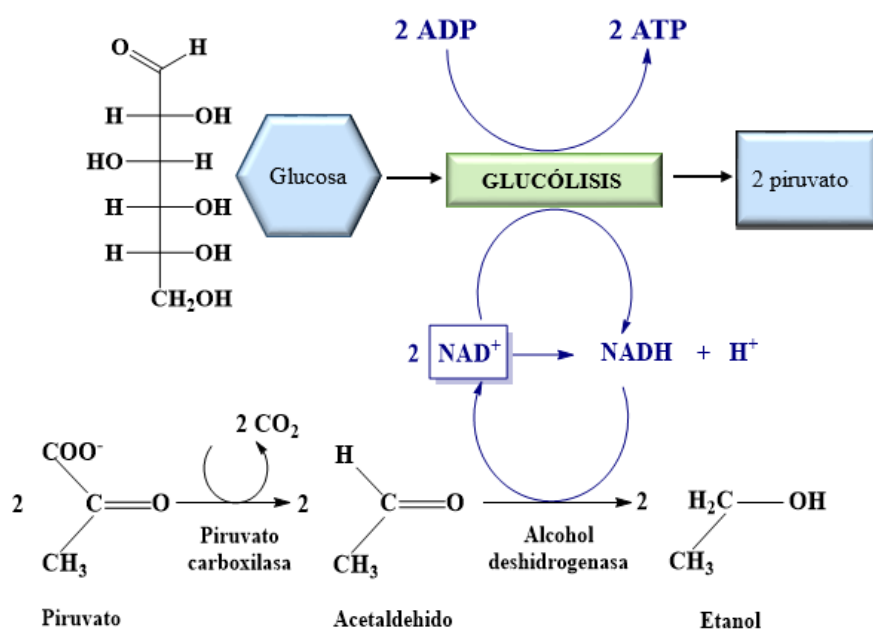


Figura 68: Reacciones químicas del metabolismo celular para la degradación de glucosa y fermentación alcohólica. (Bott, 2014)

Por otra parte, la fermentación láctica ocurre en algunos protozoos y en tejidos animales. Su principal uso resulta de la obtención de quesos, yogurt, salsa de soya, y otros productos derivados de la leche. En los tejidos en animales, se produce ácido láctico (o lactato) a partir del piruvato. En condiciones de escasez de nutrientes, la levadura utiliza otras rutas metabólicas que le permiten obtener un mayor rendimiento energético, y por tanto la fermentación no se lleva a cabo. (Bott, 2014)

4.1.2. Etapas de Crecimiento Celular: Levaduras

Las levaduras son organismos que crecen y se desarrollan de manera óptima bajo ambientes específicos. Las condiciones de temperatura, humedad, salinidad, acidez, etc., en el

medio ambiente varían en el espacio y el tiempo alejándose muchas veces de las condiciones de idealidad para el crecimiento y reproducción del organismo en cuestión. Generalmente, durante los períodos de crecimiento activo las células son susceptibles al estrés, mientras que en períodos quiescentes o de latencia son resistentes. Las levaduras muestran cinco fases de crecimiento bien definidas (Figura 69), cuando se cultivan en medios líquidos con glucosa como fuente de carbono, la *fase lag*, la *fase logarítmica*, el *cambio diáuxico*, la *fase post-diáuxica* y la *fase estacionaria*. (Jamieson, 1998; Gómez, 2012) Dichas fases de crecimiento se modelan siguiendo cinéticas de crecimiento y formación de biomasa tal como la ecuación de Monod. (Liu, 2006; Ariyajaroenwong *et al.*, 2016)

La *fase lag* es un período de adaptación en el cual la célula se prepara para dividirse. Durante la *fase logarítmica* las células alcanzan su máxima velocidad de duplicación y llevan a cabo un metabolismo fermentativo producto del cual se genera etanol. Al disminuir la concentración de glucosa, las células atraviesan por el *cambio diáuxico*, un período breve de tiempo en el cual no hay división, y la célula cambia de un metabolismo fermentativo a uno respiratorio. En la *fase post-diáuxica* las células usan como fuente de carbono el etanol producido durante la fase logarítmica e incrementan su resistencia al estrés gradualmente; en tanto que la *fase estacionaria* se presenta cuando los nutrientes del medio se han agotado y no hay división celular. En esta fase, las células acumulan carbohidratos de reserva como trehalosa y glucógeno, alcanzan el máximo nivel de resistencia a estrés y su pared celular se vuelve más gruesa y resistente. (Vidales, 1993; Alves y Guimarães, 2009)

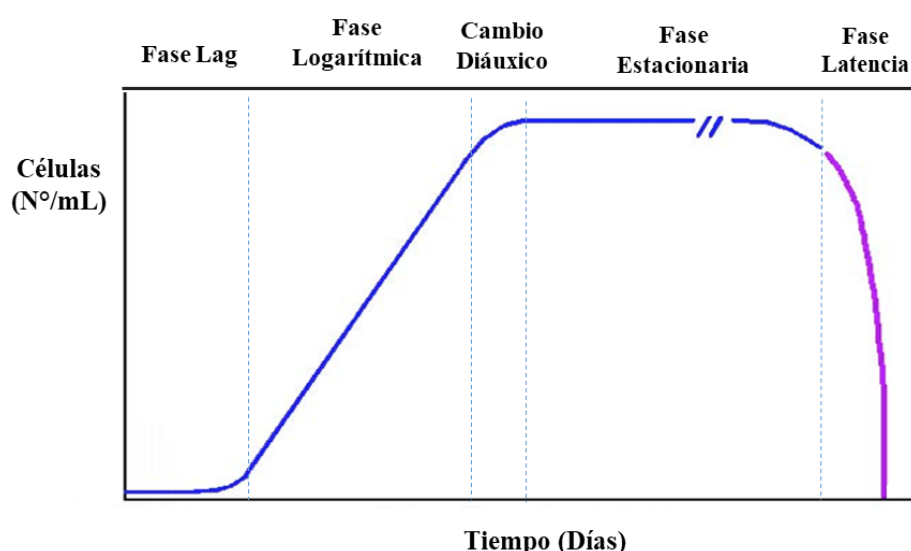


Figura 69: Etapas de crecimiento, maduración y latencia celular de levaduras.

4.1.3. Estrés en Levaduras

Las levaduras han adoptado estrategias que las llevan a modificar su metabolismo, regular su velocidad de crecimiento o modificar sus programas de diferenciación y así sobrevivir en condiciones adversas. El estrés (del latín: *stringere*: apretar, a través de su derivado en inglés *stress*: fatiga de material) es una reacción fisiológica del organismo en el que entran en juego diversos mecanismos de defensa para afrontar una situación que se percibe como amenazante, tal como una condición ambiental o un estímulo. (Fulda *et al.*, 2010) Es una respuesta natural y necesaria para la supervivencia de la levadura pero genera que ésta, durante el período de exposición al factor estresante, disminuya parcial o completamente su actividad. (Zhao y Bai, 2009) Específicamente, para la levadura *S. cerevisiae* se produce una respuesta inhibitoria frente a una situación de tensión que produce que ésta interrumpa la producción de etanol. (Ding *et al.*, 2009)

Las células de levaduras se ven sometidas a varios tipos de estrés a medida que las condiciones del medio cambian, en situaciones naturales como durante procesos industriales. Tanto el daño como la respuesta de la levadura dependen del tipo y grado de estrés y del estado de desarrollo de la levadura al momento en que ocurre el estímulo.

En general, las circunstancias adversas a las que se enfrenta este organismo afectan principalmente a las estructuras celulares y a las diferentes macromoléculas que las componen, especialmente lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, las cuales sufren modificaciones estructurales que dañan su función. (Ding *et al.*, 2009; Helena Curtis, 2010) Para hacer frente a estas situaciones desfavorables, la levadura responde rápidamente sintetizando moléculas que le permiten atenuar o reparar el daño causado por el estrés. (Zhao y Bai, 2009) Entre las moléculas mejor caracterizadas en esta respuesta están las llamadas *proteínas de estrés*. (Ruis y Schüller, 1995) Su estudio ha evidenciado que la respuesta a nivel transcripcional es importante para la supervivencia celular y ha llevado a la descripción de varias vías de transducción de señales y factores de transcripción involucrados en esta respuesta. (Schieber y Chandel, 2014)

No obstante, aun cuando el organismo posee elementos para adaptarse a los cambios en el medio que afectan a su crecimiento y reproducción, si éstos son demasiado severos o abruptos pueden llegar a ser letales y/o inhibir completamente su funcionalidad. (Revisión *et al.*, 2004) Se considera que la adaptación de la levadura a los cambios en el medio ambiente no sólo implica proteger sus funciones básicas y mantenerlas, sino también inducir procesos que

en esas condiciones la conviertan en un organismo biológicamente eficiente. (Basso *et al.*, 2008)

4.1.3.1. Estrés Hiperosmótico

Una condición de estrés hiperosmótico se define como una disminución en el potencial hídrico del ambiente en el cual se desarrolla un organismo. (Revisión *et al.*, 2004) El ambiente natural de levaduras *S. cerevisiae* son las plantas, sus frutos y los jugos de éstos, por lo que este organismo se enfrenta durante su ciclo de vida a una condición de estrés hiperosmótico dado al alto contenido de azúcares (aprox. 30 % p/v) y otros solutos presentes en su microambiente. Durante el proceso de fermentación, las levaduras se exponen a un 20 % de azúcares y, al final del proceso, a un medio relativamente libre de azúcares, pero con un 10-14 % p/p (21 % v/v) de etanol. (Galafassi *et al.*, 2013) Por lo tanto, es de esperarse que *S. cerevisiae* posea los mecanismos que le permitan percibir, responder y adaptarse a cambios en la osmolaridad externa.

La respuesta inmediata frente a una condición de estrés osmótico es una salida del agua intracelular para tratar de llevar a cabo un ajuste osmótico. Como consecuencia, las concentraciones de iones y bio-moléculas se incrementan dando como resultado una disminución en la actividad celular. Una vez que el organismo se adaptó, se retoma el crecimiento, siempre y cuando la severidad del estrés sea fisiológicamente aceptable. (Hohmann, 2002) Luego de un período de aclimatación, el crecimiento celular se reanuda. Este período varía dependiendo de factores tales como el tipo y grado de estrés, el trasfondo genético de la cepa y el estado de crecimiento. En esta fase de aclimatación las células de levadura experimentan una serie de cambios como re-estructuración del citoesqueleto, detención transitoria del ciclo celular, y reprogramación del metabolismo. (Krantz *et al.*, 2004) Conjuntamente, se estimulan mecanismos involucrados en la resistencia al estrés, como el aumento en la concentración intracelular de glicerol y la exclusión de iones tóxicos. Asimismo, se induce la expresión de una serie de genes cuyos productos participan en diferentes sistemas y/o procesos como el metabolismo *red-ox*, la producción de proteínas protectoras y el reajuste en los niveles de carbohidratos, lípidos y aminoácidos. (Ostrander y Gorman, 1999)

4.1.3.2. Estrés por Calor

La respuesta a estrés por calor en levadura es una de las más y mejor estudiadas. Un incremento de 10 a 15 °C por encima de la temperatura óptima de crecimiento induce la síntesis de un grupo de proteínas llamadas HSP (*Heat Shock Proteins*). La mayoría de las proteínas de este grupo son proteasas moleculares, involucradas en impedir la desnaturalización o inducir la re-naturalización de proteínas, la degradación de proteínas mal plegadas y la disgregación de agregados proteínicos causados por desnaturalización. (Parsell y Lindquist, 1993) El proceso de fermentación es exotérmico y las levaduras tienen un régimen de funcionamiento óptimo dentro de ciertos intervalos de temperatura óptimos. La exposición prolongada de levaduras a temperaturas superiores a 60 °C acelera su muerte. Específicamente para *S. cerevisiae*, la temperatura óptima de trabajo se encuentra alrededor de los 40-42 °C. (Farnworth, 2008)

4.1.3.3. Estrés Oxidativo

El oxígeno (O₂) es uno de los gases más importantes de la Tierra, ya que casi todos los seres vivos utilizan el oxígeno para respirar y obtener energía. Sin embargo, a partir de esta molécula, se forman durante la respiración, moléculas más reactivas conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*). (Perrone, Tan y Dawes, 2008) Las ROS son derivados del oxígeno más reactivo que el O₂ en su estado basal, regulan varios procesos celulares, pero también resultan nocivas para los organismos. Las ROS se generan endógenamente en las células, no sólo como consecuencia de la reducción incompleta del oxígeno a agua durante la respiración, sino también en otros procesos metabólicos. A pesar de las condiciones pro-oxidantes de la vida aeróbica, los organismos son capaces de mantener un ambiente *red-ox* intracelular reducido. Sin embargo, si la concentración de las ROS sobrepasa la capacidad celular para eliminarlos, se produce un estado de estrés oxidativo. (Krantz *et al.*, 2004) Existe mucha información sobre el daño a lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos mediado por los intermediarios reactivos del O₂, daños que eventualmente pueden conducir a la muerte celular. (Farrugia y Balzan, 2012) Para combatir el estrés oxidativo por exposición a las ROS y proteger los componentes celulares, los organismos constantemente detectan y se adaptan a cualquier perturbación mediante una batería de defensa antioxidante conformada por sistemas enzimáticos y no enzimáticos. (Toledano *et al.*, 2003)

4.1.4. Limitaciones del Proceso de Fermentación

El estudio de los factores que restringen la glucólisis fermentativa del etanol son complejos, debido a la naturaleza de los parámetros involucrados y al sinergismo entre los mismos, entre ellos se destacan:

- ❖ **Concentración de etanol resultante:** Una de las principales limitaciones del proceso, es la resistencia de las levaduras a las elevadas concentraciones de etanol que se llegan a producir durante la fermentación. *S. cerevisiae* puede llegar a soportar hasta un máximo de 21 % v/v concentración alcohólica.(Lagunas *et al.*, 1982)
- ❖ **Acidez del sustrato:** El pH es un factor limitante en el proceso de la fermentación ya que las levaduras se encuentran afectadas fuertemente por el ambiente, bien sea alcalino o ácido. Si bien existen diversos criterios a la hora de definir un pH de trabajo óptimo, por regla general, el funcionamiento de las levaduras está limitado a medios de reacción ligeramente ácidos, en un rango aproximado de 6,5 a 7,2 pH.(Gallego Gil, 2007)
- ❖ **Concentración de azúcares:** La concentración excesiva de hidratos de carbono en forma de monosacáridos y disacáridos puede interrumpir la actividad microbiana.(Manchester, 2007) De la misma forma, la baja concentración puede apaciguar el proceso. Las concentraciones de azúcares afectan a los procesos de ósmosis dentro de la membrana celular. Las concentraciones límite dependen del tipo de azúcar, así como de la levadura responsable de la fermentación.
- ❖ **Contacto con el aire:** La intervención de oxígeno provoca la detención de los procesos fermentativos en forma instantánea (Efecto Pasteur), es por eso que los bio-reactores deben mantenerse completamente aislados del oxígeno del aire durante toda la fermentación.(Manchester, 2007)
- ❖ **Cambios de temperatura:** El proceso de fermentación es exotérmico, y las levaduras tienen un régimen de funcionamiento óptimo dentro de ciertos intervalos de temperatura óptimos. Si se expone cualquier levadura a una temperatura cercana o superior a 55 °C por un tiempo de 5 min se produce su muerte. La temperatura óptima de trabajo se encuentra alrededor de los 40-42 °C.(Ylitzvo, Franzén y Taherzadeh, 2011)
- ❖ **Crecimiento celular:** Durante la fermentación las cepas microbianas crecen en número y en tamaño debido a las condiciones favorables del medio; esto hace que se incremente la concentración de levaduras, se produzcan aglomeraciones de colonias celulares y se utilicen nutrientes para procesos no fermentativos.

4.2. Materiales y Métodos Experimentales

4.2.1. Materiales

Todos los reactivos químicos utilizados fueron de calidad analítica (Sigma-Aldrich/Cicarelli). Las levaduras deshidratadas en polvo *Sacharomyces cerevisiae* (Bio-Tech Co., Ltd) fueron provistas por cortesía de la empresa Bio 4 (Bioetanol Río Cuarto S.A.). Las soluciones buffers utilizadas se detallan en el Anexo I.

4.2.1.1. Preparación de Levaduras Inmovilizadas

Células de *S. cerevisiae* fueron inmovilizadas en una red entrecruzada formada *in situ* durante la polimerización radicalaria de monómeros vinílicos en presencia de un entrecruzador. Las levaduras inmovilizadas en hidrogeles de poliacrilamida se prepararon mediante el método de inmovilización por atrapamiento (Ver Sección 2.6.3.2). Las levaduras fueron inmovilizadas durante la polimerización radicalaria en modo tradicional para obtener hidrogeles compactos y por crio-polimerización (Sección 2.7.3) para obtener hidrogeles macroporosos.

Algunas de las características que ofrecen estos materiales es una estructura tipo *foam*, más permeable y resistente a esfuerzos de corte.(Molina, 2011) En todos los casos, las cantidades de levaduras *S. cerevisiae* incorporadas a las matrices de inmovilización fueron reportadas.

4.2.1.2. Preparación de Levaduras Inmovilizadas en Hidrogeles Nanoporosos

Las levaduras inmovilizadas se obtuvieron mediante la síntesis de hidrogeles vía polimerización radicalaria con una suspensión de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. El medio de síntesis fue ligeramente básico regulado mediante buffer de fosfato (pH 7,2). Como monómero se utilizó AAm (1 M, Aldrich) y como agente entrecruzador químico N, N'-metilenbisacrilamida (BIS, Aldrich) relación molar 0,02:1 de BIS a monómero. Persulfato de amonio (APS, 1 mg mL⁻¹, Aldrich) y N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED, 10 µL mL⁻¹, Aldrich) fueron utilizados como sistema iniciador. Los compuestos químicos AAm, BIS y APS en buffer de fosfato constituyen la mezcla pre-gelificante (PGM). En 4 mL de esta solución se disolvió *S. cerevisiae* en el rango de concentraciones de 25 a 250 mg mL⁻¹ y se colocó en un vortex durante 10 s para homogenizar.

4.2.1.3. Preparación de Levaduras Inmovilizadas en Hidrogeles Macroporosos

Para obtener geles macroporosos, la polimerización fue llevada a cabo análogamente a la descrita para hidrogeles compactos pero a una temperatura inferior a la temperatura de fusión del agua, por lo que PGM con las levaduras suspendidas fue enfriada en baño de salmuera (0,1 M KCl, -5 °C) durante 1 h, inmediatamente se agregó TEMED en la cantidad especificada y se refrigeró hasta -18 °C, durante 24 h. Así, la polimerización (retardada por baja temperatura) ocurrió bajo estas condiciones. Se obtuvieron geles macroporosos (poros < 1 µm) amorfos.

Los hidrogeles fueron lavados en agua destilada para remover vestigios de reactivos no consumidos y posteriormente secados en estufa en vacío a 30 °C. Se obtuvieron pastillas discoidales de dos diámetros diferentes (según el molde utilizado para la síntesis) y con distinta carga celular. Las estructuras químicas de los monómeros componentes del hidrogel, se presentaron en la Sección 2.7.2.1 y son las mismas que las utilizadas para inmovilización de enzimas. La Figura 70 es una fotografía de los hidrogeles sintetizados. Las propiedades principales de los materiales sintetizados se muestran en Tabla 13.

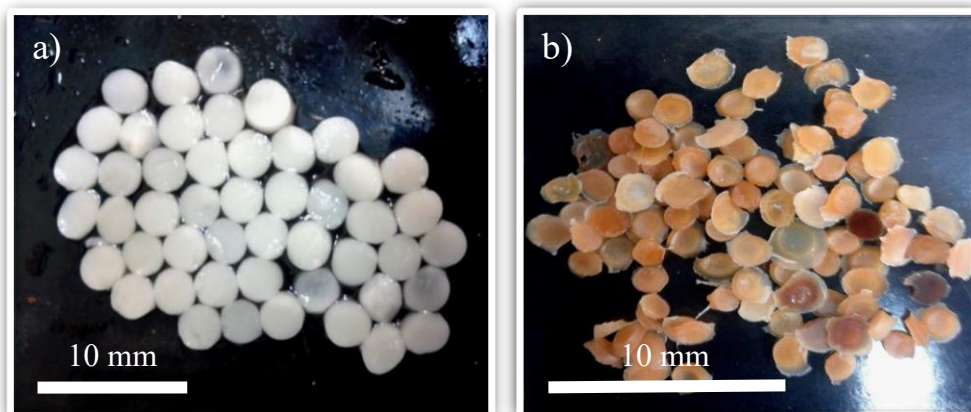


Figura 70: Hidrogeles macroporosos de poliacrilamida con *S. cerevisiae* inmovilizadas por atrapamiento. Estado a) hidratado b) deshidratado.

Tabla 13: Hidrogeles de poliacrilamida (AAM 1 M) con levaduras *S. cerevisiae* (PAAM-Sc).

	Materiales	Carga celular (mg mL⁻¹ Sn)	Temperatura	Características
<i>Discos 0,5cm x 1mm</i>	<i>PAAM-2</i>	0,00	25°C	<i>Compacto</i>
	<i>PAAM-Sc-1</i>	50	25°C	<i>Compacto</i>
	<i>PAAM-Sc-2</i>	175	25°C	<i>Compacto</i>
	<i>PAAM-Sc-3</i>	50	-18°C	<i>Macroporoso</i>
	<i>PAAM-Sc-4</i>	75	-18°C	<i>Macroporoso</i>
	<i>PAAM-Sc-5</i>	125	-18°C	<i>Macroporoso</i>
	<i>PAAM-Sc-6</i>	175	-18°C	<i>Macroporoso</i>
	<i>PAAM-Sc-7</i>	250	-18°C	<i>Macroporoso</i>
<i>Discos 0,3cm x 0,7mm</i>	<i>PAAM-3</i>	0,00	25°C	<i>Compacto</i>
	<i>PAAM-Sc-7</i>	50	-18°C	<i>Macroporoso</i>
	<i>PAAM-Sc-8</i>	75	-18°C	<i>Macroporoso</i>
	<i>PAAM-Sc-9</i>	175	-18°C	<i>Macroporoso</i>
	<i>PAAM-Sc-10</i>	250	-18°C	<i>Macroporoso</i>

4.2.2. Métodos de Análisis y Caracterización

La caracterización del sistema de levaduras inmovilizadas se realizó de dos maneras. Por un lado, se analizó cómo fue afectado el hidrogel por la incorporación celular. Para esto se realizaron medidas de eficiencia de inmovilización, resistencia mecánica, termogravimetría y calorimetría diferencial de barrido. Por otro lado, se estudió cómo fue afectada la célula debido a la inmovilización dentro de una matriz polimérica. Ensayos para la determinación de la viabilidad celular, se realizaron para este caso. Finalmente fue analizada la capacidad catalítica de levaduras inmovilizadas en el proceso de fermentación comparándolo con el proceso clásico de fermentación utilizando levaduras libres en similares condiciones experimentales.

4.2.2.1. Eficiencia de Inmovilización

La cantidad de levadura inmovilizada dentro de las matrices de hidrogel se determinó gravimétricamente, restando a la cantidad de levadura originalmente agregada durante la síntesis, la cantidad de levadura presente en el medio de lavado (agua destilada), la cual se obtuvo por centrifugación y secado. La eficiencia de inmovilización se define como el porcentaje en peso de levadura que se ha inmovilizado en la matriz respecto al

peso de levadura inicial. Así, la eficiencia de inmovilización del componente activo en el soporte fue definido a través de:

Ecuación 11: Eficiencia de Inmovilización de Levaduras

$$\% \eta_{ISC} = \frac{m_o - m_{Sc}}{m_o} \times 100$$

donde: m_o y m_{Sc} representan la masa de levadura original incorporada a la PGM y la masa de levadura residual en el medio de cultivo post-polimerización, respectivamente. Se midieron las eficiencias de inmovilización PAAm-Sc con distinta carga celular, previa exposición de las mismas durante 24 h en solución buffer de fosfato.

4.2.2.2. Análisis del Porcentaje de Hinchamiento en Matrices de Inmovilización

Como ya fue señalado en la Sección 3.3.1.1, la capacidad de hidrogeles de absorber agua se conoce como *swelling* o grado de hinchamiento. Los hidrogeles deshidratados, con y sin células inmovilizadas, previamente pesados, fueron inmersos en solución buffer de fosfato (pH 7,2). Se calculó el porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles con y sin levadura en función del tiempo mediante la Ecuación 2.

Con los datos obtenidos de porcentaje de hinchamiento en función del tiempo se construyó la cinética de hinchamiento. Asimismo, se calculó el porcentaje de hinchamiento de los geles luego de 24 h (1500 min) de inmersión en solución, cuando el hinchamiento alcanzó su estado de equilibrio.

4.2.2.3. Análisis de Resistencia Mecánica

Fueron realizadas experiencias de determinación de módulo de elasticidad para distintas cargas de levadura y para hidrogeles puros. Los detalles del procedimiento de medida fueron detallados en la Sección 3.3.1.6.1. Se midieron módulos de elasticidad para hidrogeles prístinos (PAAm-2 y PAAm-2) e hidrogeles con levaduras inmovilizadas (PAAm-Sc-1 a PAAm-Sc-6) hidratados en agua destilada. Las medidas fueron realizadas por triplicado a temperatura ambiente y presión atmosférica.

4.2.2.4. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido (*Differential Scanning Calorimetry* o DSC) es una técnica experimental dinámica que permite determinar la cantidad de calor absorbido o liberado por una sustancia, cuando esta se mantiene a temperatura constante, durante un tiempo determinado, o cuando es sometida a un programa de calentamiento y/o enfriamiento a velocidad constante, en un determinado intervalo de temperaturas. Como regla general, puede decirse que todas las transformaciones físicas o químicas que involucren un cambio de energía química del material, pueden medirse por DSC.

4.2.2.5. Análisis Termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA) es la técnica que mide el cambio de masa de una muestra mientras se somete a un programa de temperaturas controlado, bajo atmósfera definida. Esta técnica se emplea en el estudio de aquellos procesos térmicos que llevan asociados cambios en la masa (descomposición, sublimación, vaporización, etc.). Se realizó TGA a hidrogeles con y sin enzimas para determinar posible interacciones polímero-enzima que modifiquen la estructura del material, también fue posible determinar mediante esta técnica la temperatura de desnaturalización proteica y temperatura de descomposición del polímero. Por definición la temperatura de desnaturalización proteica corresponde a la temperatura en la cual la proteína pierde el 50 % de su masa original. (Al-Sabagh *et al.*, 2013)

Para este análisis se utilizó un equipo Netzsch TG 209 F1 Libra con balanza térmica incorporada. La medición se realizó en atmósfera de nitrógeno, con un flujo de nitrógeno de 20 mL min⁻¹ y una rampa de calentamiento de 10 K min⁻¹ desde 25 °C a 350 °C. Para la medición, la muestra fue colocada en un crisol de alúmina abierto en la parte superior. Se eligieron las siguientes condiciones de trabajo: 10 - 15 mg del hidrogel seco, calentamiento desde 50 °C a 300 °C, a 5 °C min⁻¹ bajo atmósfera (200 mL min⁻¹) de nitrógeno de alta pureza. Cada muestra se analizó por triplicado, y se informó al valor medio. El error experimental de estas mediciones era para todas las muestras estudiadas de $\pm 0,5\%$ en la medición de la pérdida de peso y ± 2 °C en la medición de la temperatura.

Se realizó TGA a hidrogeles con y sin levaduras para determinar los porcentajes máxicos de agua ligada, no ligada y contenido proteico en PAAm-Sc. También es posible determinar mediante esta técnica la temperatura de desnaturalización proteica de *S.*

cerevisiae en su condición inmovilizada y libre.(Blaho, 2007) Para este análisis se utilizó un termogravímetro Netzsch TG 209 F1-Libra con balanza térmica incorporada. La medición se realizó en atmósfera de nitrógeno, con un flujo de nitrógeno de 20 mL min⁻¹ y una rampa de calentamiento de 10 °C min⁻¹ desde 25 °C a 350 °C. Para la medición, la muestra fue colocada en un crisol de alúmina abierto.

4.2.2.6. Viabilidad Celular

La viabilidad celular consiste en la determinación del número total de células vivas, en base a una muestra total de células. Células vivas hace referencia a toda célula viva susceptible o no de reproducirse.(Stanley *et al.*, 2010) Para determinar la viabilidad celular en PAAm-Sc se realizó una tinción con azul de metileno sobre levaduras disueltas en agua destilada o fracciones de discos de hidrogel con y sin levaduras, previamente hidratados en agua destilada durante 24 h. El azul de metileno tiñe el citoplasma celular sólo de las células muertas, las células vivas no son coloreadas por este colorante.(Strober, 2001; Bicas, Kleinegris y Barbosa, 2015) Se realizó el recuento celular estadístico de PAAm-Sc utilizando una población de 10 pastillas de hidrogel arbitrariamente seleccionadas. En cada una se realizó un recuento microbiano de mínimo tres campos de 5 µm x 5 µm, dispuestos entre sí en forma de guarda geométrica y analizadas mediante microscopio óptico binocular Arcano X57107E, con objetivo 40 X.

Las levaduras libres, vivas y muertas fueron cuantificadas análogamente, pero mediante diluciones sucesivas, en una cámara de *Neubauer*. La cámara de *Neubauer* (Figura 71) es un instrumento utilizado en medicina y biología para realizar el recuento de esporas y células en un medio líquido.(Talking *et al.*, 2014) Esta cámara de recuento está adaptada al microscopio de campo. Se trata de un portaobjetos que tiene dos zonas ligeramente hundidas en cuyo fondo se ha marcado una cuadrícula de dimensiones conocidas. La cámara se cubre con un cubreobjetos que se adhiere por simple tensión superficial. Cada cuadrícula, según las dimensiones que posea, se utilizará para el conteo de células específicas de acuerdo a su tamaño (por ejemplo, glóbulos rojos se cuantifican en las cuadrículas exteriores ubicadas en las cuatro esquinas de la cámara, mientras que levaduras y esporas se cuentan en la cuadrícula central). Tras una dilución previa, se introduce entre la cámara y el cubreobjeto, el líquido con las células, tal como se

esquematiza en la Figura 71. Se observa la retícula al microscopio con el aumento adecuado y se cuentan las células en cuadrantes arbitrarios no consecutivos.

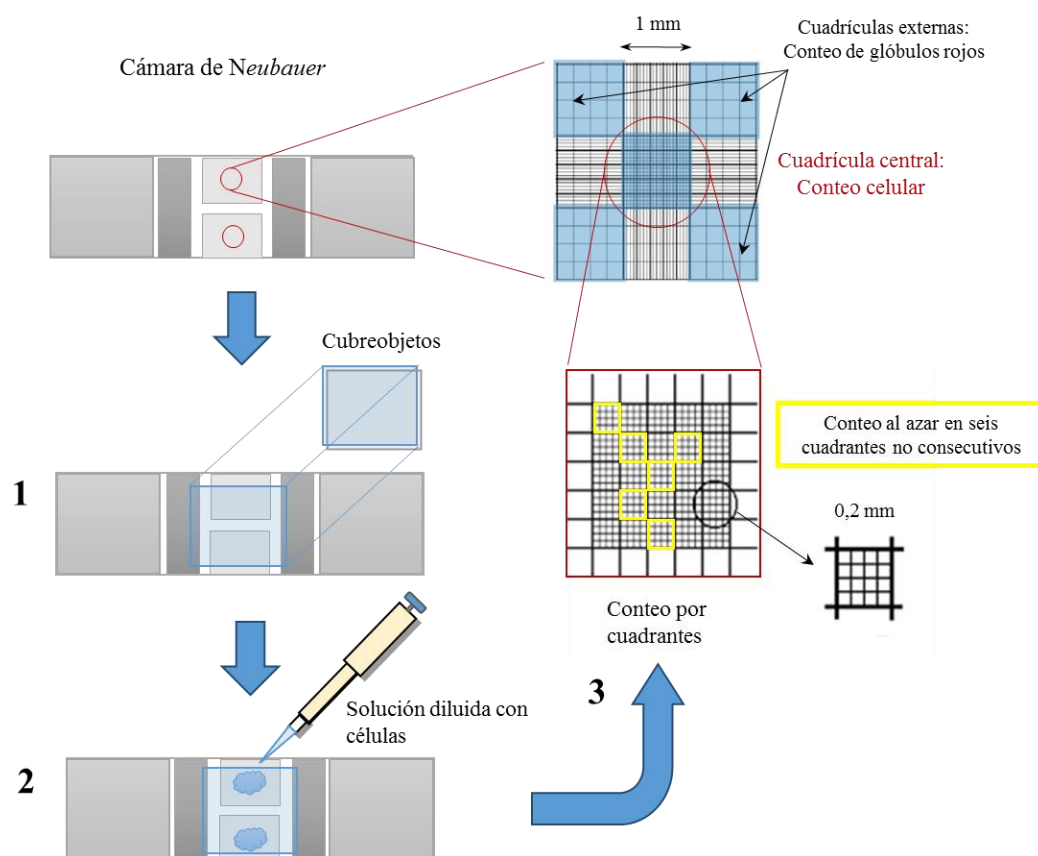


Figura 71: Esquema de trabajo en una cámara de *Neubauer*. 1) Se adhiere por capilaridad el cubreobjetos a la cámara de conteo. 2) Se siembra la muestra utilizando micropipeta. 3) Se procede al conteo celular en la cuadrícula central seleccionando cuadrantes no consecutivos, mediante microscopio óptico.

A partir del número de células vivas y muertas, conociendo el volumen de líquido (para el caso de levaduras libres) y el área de análisis (levaduras inmovilizadas en hidrogeles), fueron calculados la densidad superficial y el porcentaje de células vivas. Como criterio de cuantificación, para células ubicadas sobre las líneas de las cuadrículas, se consideraron dentro de la superficie a las células ubicadas sobre los laterales izquierdo y superior, y fuera de la superficie a las células ubicadas en los laterales derecho e inferior. A modo de ejemplo, consideremos la Figura 72 la cual representa un esquema de una de las 16 cuadrículas centrales de 0,2 mm (que a su vez está dividida en 16 cuadrantes 0,04 mm). Las células vivas totales son 17, dos de estas células se ubican sobre los laterales superior e izquierdo, una célula viva restante ubicada sobre la línea inferior no debe ser incluida en

el conteo. Las células muertas son 10, incluyendo dos células sobre el lateral izquierdo y excluyendo dos células del lateral inferior, de igual modo al caso anterior.

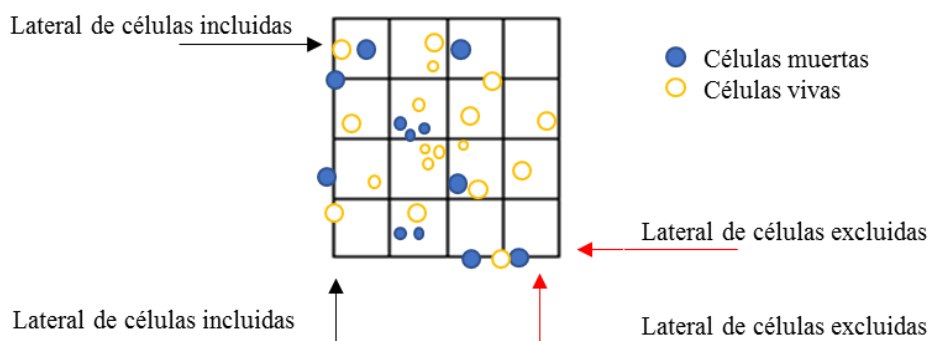


Figura 72: Representación esquemática de una cuadrícula central (0,2 mm) de la cámara de Neubauer con células vivas y muertas

Para calcular el porcentaje de células vivas, tanto libres como inmovilizadas, se utiliza la **Error! Reference source not found.** y la Ecuación 13 para calcular la densidad celular.

Ecuación 12: Viabilidad Celular

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Células vivas}}{\text{Células totales}} \times 100$$

Ecuación 13: Densidad Celular

$$\% \text{ Densidad celular} = \frac{\text{Células vivas}}{\text{Superficie de análisis}} \times 100$$

4.2.2.7. Reacción de Fermentación

La reacción de fermentación se estudió de dos formas. En primer término, se analizaron ciclos de fermentación de 120 min, previa hidratación del inóculo (levaduras) durante 2 h en agua destilada. Durante dichos ciclos de fermentación, se analizaron las siguientes variables de reacción: temperatura, concentración inicial de glucosa, difusión y tolerancia a exposición a etanol. Los mejores resultados, orientaron los ciclos de fermentación a tiempo industrial (90 h). La reacción de fermentación se llevó a cabo tanto para levaduras en suspensión (libres) como inmovilizadas. La producción de etanol y el consumo de glucosa fueron monitoreados para todos los casos.

4.2.2.7.1. Parte I: Ciclos Breves de Fermentación

La eficiencia catalítica de PAAm-Sc-5 fue estudiada mediante un proceso fermentativo a escala laboratorio. La reacción de fermentación se llevó a cabo en forma discontinua, utilizando un reactor de 250 mL. Como medio de cultivo fue empleada una solución azucarada (glucosa monohidratada, 3 % p/v, Cicarelli) como fuente de energía y carbono, y Urea como fuente nitrogenada (Urea, 0,01 p/v, Sigma-Aldrich) en buffer de fosfato (pH 7,2). La mezcla de reacción se agitó a 250 rpm y aclimató a 42°C en un sistema isotérmico (Hel NPR 121 Semedic Briket). Se trabajó a reactor lleno y sellado para lograr la condición de anaerobicidad.

Para todos los casos analizados, las condiciones mencionadas (42 °C, pH 7,2, 250 rpm, 3 % p/v glucosa) se consideraron como las condiciones normales de reacción. La Figura 73 muestra una fotografía del sistema utilizado.



Figura 73: Reactor de laboratorio para ciclos de fermentación anaeróbica de 120 min.

Mediante el acople al sistema de una bureta de gases (llena de agua), se cuantificó volumétricamente el dióxido de carbono producido por las levaduras. Este gas desplaza el agua de la bureta de gases lo que provoca un cambio de volumen que se registra en la bureta graduada, como se detalla en la Figura 74.

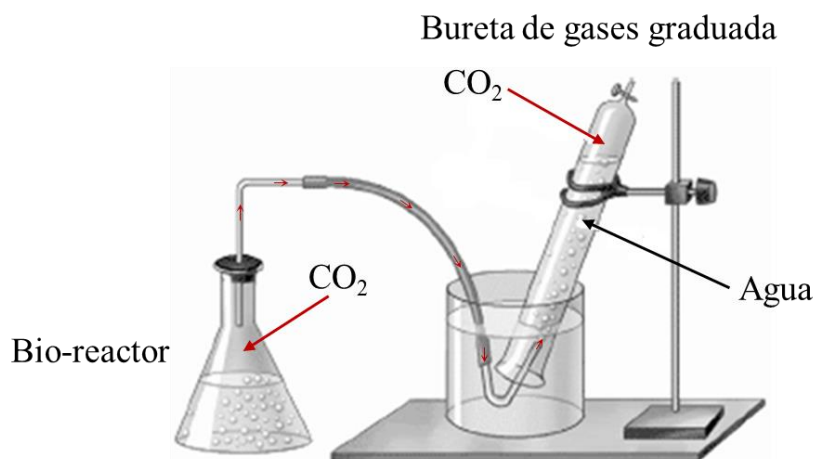


Figura 74: Esquema del sistema de monitoreo de dióxido de carbono.

Se calculó el rendimiento de etanol (η) (**Ecuación 14**) expresado como la razón porcentual entre la concentración de etanol obtenida experimentalmente ($[EtOH]_{Real}$) y la máxima concentración factible de alcanzarse de etanol por un mol de glucosa (10,87 g) en condiciones ideales ($[EtOH]_{Teo}$). (Efficiency y Energy, 2009)

Ecuación 14: Rendimiento de Etanol

$$\eta = \frac{[EtOH]_{Real}}{[EtOH]_{Teo}} \times 100$$

La reacción química de fermentación de glucosa, considerando como únicos productos etanol, energía y dióxido de carbono (condición teórica), se muestra en la Reacción 1, Sección 2.5.2. El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0,511 g de etanol y 0,489 g de CO_2 por 1,000 g de glucosa. Este valor fue cuantificado por primera vez por Gay Lussac. (Efficiency y Energy, 2009) En la práctica es imposible lograr este rendimiento, ya que como se señaló anteriormente, las levaduras utilizan glucosa para la producción de otros metabolitos y productos. El rendimiento experimental en un bio-reactor de laboratorio varía entre 80 % y 85 % del teórico, es decir, de 0,469 a 0,485 g g^{-1} . Los rendimientos en fermentaciones industriales varían entre 67 y 83 % del rendimiento teórico. (Chen *et al.*, 2012)

4.2.2.7.1.1. Influencia de la Temperatura y Concentración Inicial de Glucosa

Levaduras inmovilizadas y libres fueron expuestas a los siguientes cambios en las variables de reacción:

- Aumento de la temperatura de reacción: 45 °C, 50 °C, 65 °C.
- Incremento en la concentración inicial de fuente carbonada: 10 % p/v; 15 % p/v.

La Tabla 14 muestra las experiencias realizadas.

Tabla 14: Fermentación de etanol a partir de glucosa variando concentración inicial de glucosa y temperatura de reacción. En todos los casos el pH del medio de cultivo fue de 7,2 y la velocidad de agitación de 250 rpm.

Material	N° Exp.	[Glucosa] ₀ (% p/v)	Temperatura (°C)	[Inóculo] ₀ (mg Sc/mL) // Uds. cataliz. inmovilizados
<i>S. cerevisiae</i>	1	3	42	4 x 10 ³
	2	10	42	4 x 10 ³
	3	15	42	4 x 10 ³
	4	3	45	4 x 10 ³
	5	10	45	4 x 10 ³
	6	15	45	4 x 10 ³
	7	3	50	4 x 10 ³
	8	10	50	4 x 10 ³
	9	15	50	4 x 10 ³
	10	3	65	4 x 10 ³
	11	10	65	4 x 10 ³
	12	15	65	4 x 10 ³
<i>PAAm-Sc-6</i>	13	3	42	175//100
	14	10	42	175//100
	15	15	42	175//100
	16	3	45	175//100
	17	10	45	175//100
	18	15	45	175//100
	19	3	50	175//100
	20	10	50	175//100
	21	15	50	175//100
	22	3	65	175//100
	23	10	65	175//100
	24	15	65	175//100

4.2.2.7.1.2. Influencia de Efectos Difusionales

Fue examinada la eficiencia de la reacción para matrices con distinta carga: PAAm-Sc-1,4,5 y 6. Se trabajó en condiciones normales de operación. En la Tabla 15 se resumen los ensayos realizados.

Tabla 15: Condiciones experimentales para fermentación de etanol a partir de glucosa utilizando diferentes cargas *S. cerevisiae* en hidrogeles.

Materiales	N° Exp.	[Glucosa] ₀ , % p/v	Temperatura, °C	[Inóculo] ₀ , mg Sc mL ⁻¹ // Uds. cataliz. inmovilizados
<i>PAAm-Sc-1</i>	25	3	42	50 // 250
<i>PAAm-Sc-4</i>	26	3	42	75 // 167
<i>PAAm-Sc-6</i>	27	3	42	175 // 100
<i>PAAm-Sc-7</i>	28	3	42	500 // 50

4.2.2.7.1.3. Influencia del Área Superficial

Se evaluó la influencia de la morfología y el área superficial en la velocidad de fermentación, realizando fermentaciones en condiciones normales con hidrogeles de la misma carga celular (42 °C, pH = 7,2, glucosa 3 % p/v, 175 mg mL⁻¹ Sc), pero distinta morfología (discos de diámetro 0,5 cm x 1,0 mm de espesor, discos de 0,3 cm x 0,7 mm y esferas de diámetro 0,5 mm). Las experiencias realizadas se encuentran resumidas en la Tabla 16.

Tabla 16: Condiciones experimentales para fermentación de etanol a partir de glucosa utilizando diferentes morfologías de matrices de inmovilización *S. cerevisiae* en hidrogeles. En todos los casos el pH del medio de cultivo fue de 7,2 y la velocidad de agitación de 250 rpm.

Materiales	N° Exp.	[Glucosa] ₀ , % p/v	Temperatura, °C	[Inóculo] ₀ , mg Sc mL ⁻¹ // Uds. cataliz. inmovilizados
<i>PAAm-Sc-6</i>	29	3	42	175 // 100
<i>PAAm-Sc-9</i>	30	3	42	175 // 180

4.2.2.7.2. Reutilización Celular

Fue analizada la capacidad de reutilización de levaduras inmovilizadas en hasta cinco ciclos fermentativos consecutivos, en PAAm-Sc-6 y en condiciones normales de operación (42 °C, pH 7,2 , 250 rpm y glucosa 3 % p/v). Entre cada ciclo de fermentación las PAAm-Sc-6 fueron extraídas del medio de cultivo mediante una filtración con malla de 50 mesh lavadas con agua destilada y reincorporadas a una nueva solución de glucosa con medio de cultivo nuevo. Para obtener datos comparativos, los mismos ciclos de fermentación fueron realizados para *S. cerevisiae* libres (en solución), con la salvedad de que en lugar de ser filtradas las levaduras se recuperaron del medio de cultivo mediante centrifugación (150.000 rpm, 15 min), se extrajo el sobrenadante y se reincorporó la levadura al medio de reacción.

Tabla 17: Condiciones experimentales para fermentación de etanol a partir de glucosa. Análisis de la reusabilidad. En todos los casos el pH del medio de cultivo fue de 7,2, la velocidad de agitación de 250 rpm y T= 42°C.

Material	Nº Exp.	Ciclos	[Glucosa] ₀ , % p/v	Temperatura, °C	[Inóculo] ₀ , mg Sc mL ⁻¹ // Uds. cataliz. inmovilizados
<i>S. cerevisiae</i>	31	Ciclo 1	3	42	4 x 10 ⁻³
	32	Ciclo 2	3	42	4 x 10 ⁻³
	33	Ciclo 3	3	42	4 x 10 ⁻³
	34	Ciclo 4	3	42	4 x 10 ⁻³
PAAm-Sc-6	35	Ciclo 1	3	42	175 // 100
	36	Ciclo 2	3	42	175 // 100
	37	Ciclo 3	3	42	175 // 100
	38	Ciclo 3	3	42	175 // 100
	39	Ciclo 4	3	42	175 // 100

4.2.2.7.3. Análisis de Concentración de Etanol

Se analizó la influencia del incremento en la concentración de etanol (14 % v/v, 21 % v/v, 96 % v/v) y el tiempo de exposición del mismo sobre el sistema (10 min, 30 min, 60 min). Estas variables no afectan al proceso de fermentación en sí mismo sino a un proceso que, industrialmente, se ubica aguas arriba a éste: el proceso de destilación. Una vez producido el etanol, el agua contenida en el mismo debe extraerse para aumentar su

concentración. Es sabido que el proceso de estrés osmótico que las levaduras *S. cerevisiae* sufren en presencia de concentraciones de etanol son superiores al 14 % v/v. (Razmovski y Vučurović, 2011) En consecuencia, la producción de etanol disminuye. Como ya fue mencionado, la inmovilización celular podría atenuar parcialmente este problema, generando un microambiente alrededor de las células, accesible a una menor cantidad de moléculas de etanol, disminuyendo así la supresión de la producción de etanol.

Las experiencias realizadas se describen en la Tabla 18, y en cada una se evaluó el valor umbral de concentración de etanol soportables para levaduras libres e inmovilizadas. Así mismo, tratándose de una estructura polimérica hidrofílica, el hidrogel de PAAm prístino también sufre transformaciones en su estructura física al ser expuesto a etanol, dicho comportamiento también fue estudiado.

Tabla 18: Condiciones experimentales para fermentación anaeróbica de etanol a partir de glucosa en levaduras inmovilizadas. Análisis de tolerancia a exposición de etanol y tiempo de exposición a etanol.

Material	Nº Exp.	[EtOH], % v/v	Tiempo de exposición, min	[Inóculo] ₀ , mg Sc mL ⁻¹ // Uds. cataliz. inmovilizados
<i>S. cerevisiae</i>	40	14	10	1 x 10 ⁻⁴
	41	14	30	1 x 10 ⁻⁴
	42	14	60	1 x 10 ⁻⁴
	43	21	10	1 x 10 ⁻⁴
	44	21	30	1 x 10 ⁻⁴
	45	21	60	1 x 10 ⁻⁴
	46	96	10	1 x 10 ⁻⁴
	47	96	30	1 x 10 ⁻⁴
PAAm-Sc-6	48	96	60	1 x 10 ⁻⁴
	49	14	10	175 // 10
	50	14	30	175 // 10
	51	14	60	175 // 10
	52	21	10	175 // 10
	53	21	30	175 // 10
	54	21	60	175 // 10
	55	96	10	175 // 10
	56	96	30	175 // 10
	57	96	60	175 // 10

4.2.2.7.4. Parte II: Fermentación en Tiempo de Reacción Industrial.

Se realizaron ciclos de 90 h de fermentación anaeróbica correspondiente al tiempo de reacción en escala industrial. Las variables que fueron objeto de estudio durante la fermentación fueron el consumo de glucosa (g L^{-1}), el rendimiento de etanol y la productividad del etanol ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$). Además, se midió la viabilidad celular y la formación de biomasa al principio y al final de cada proceso de fermentación para analizar posibles fugas o crecimiento celular fuera de las matrices de inmovilización. La reacción de fermentación se llevó a cabo en forma discontinua, utilizando un reactor de 250 mL. En la Figura 75 se muestra el sistema de reacción. El reactor de la Figura 75.a. corresponde a la reacción de fermentación utilizando levaduras libres y el de la Figura 75.b. al de levaduras inmovilizadas.

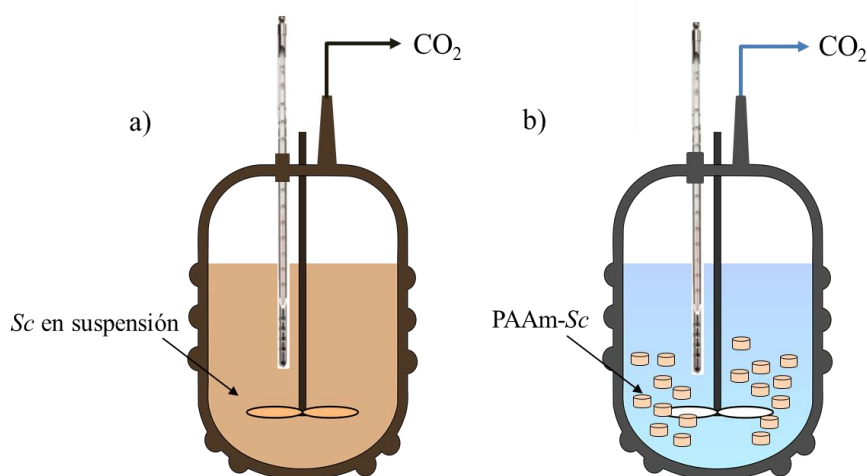


Figura 75: Bio-reactores de fermentación discontinuos de glucosa mediante *S. cerevisiae* (a) libres e (b) inmovilizadas PAAm-Sc-6.

Las cantidades másicas iniciales de levaduras fueron las mismas para ambos casos. Para levaduras inmovilizadas la carga de levaduras utilizada en este caso fue de $0,175 \text{ g mL}^{-1}$. Como medio de cultivo fue empleada una solución azucarada (glucosa monohidratada, Cicarelli) en concentración de 3 % p/p y 10 % p/p, como fuente de energía y carbono, y Urea como fuente nitrogenada (Urea, 0,01 p/v, Sigma-Aldrich) en buffer de fosfato (pH 7,2). La mezcla de reacción se agitó a 250 rpm y 42°C en un sistema isotérmico.

Se tomaron muestras de 1 mL cada 5 h de fermentación durante las primeras 24 h y cada 8 h de reacción para tiempos posteriores. Las muestras se extrajeron del medio de

reacción y se centrifugaron a 150.000 rpm durante 10 min para separar las levaduras y el sobrenadante fue extraído y almacenado a 5 °C para detener la reacción.

En la Tabla 19 se detallan las condiciones experimentales de cada ensayo. Se realizaron simultáneamente dos ciclos de fermentación, con levaduras libres e inmovilizadas. Luego de cada ciclo las levaduras inmovilizadas se separaron por filtración e incorporaron a un nuevo ciclo fermentativo con medio de cultivo nuevo y glucosa; mientras que las levaduras libres se extrajeron del sistema mediante centrifugación y de la misma forma reincorporaron a la siguiente reacción con medio y fuente carbonada nuevos. Asimismo, se comparó la reacción de fermentación para levaduras libres y levaduras inmovilizadas reutilizadas. Por último, se ensayaron experiencias modificando la concentración inicial de glucosa y la temperatura de reacción. En todos los casos se midió la viabilidad celular al inicio y al final de cada ciclo de reacción.

Tabla 19: Condiciones experimentales de ciclos consecutivos de fermentación de etanol a partir de glucosa utilizando *S. cerevisiae* en hidrogeles de poli(acrilamida). Para todos los casos pH = 7,2; T = 42 °C y $\omega_{\text{mix}} = 250$ rpm

Material	N° Exp.	Ciclo	[Glucosa] ₀ , % p/v	[Inóculo] ₀ , mg Sc mL ⁻¹ // Uds. cataliz. inmovilizados
<i>S. cerevisiae</i>	58	Ciclo 1	3	4 x 10 ⁻³
	59	Ciclo 2	3	4 x 10 ⁻³
	60	Ciclo 3	3	4 x 10 ⁻³
	61	Ciclo 4	10	4 x 10 ⁻³
	62	Ciclo 5	10	4 x 10 ⁻³
PAAm-Sc-6	63	Ciclo 1	3	175 // 100
	64	Ciclo 2	3	175 // 100
	65	Ciclo 3	3	175 // 100
	66	Ciclo 4	10	175 // 100
	67	Ciclo 5	10	175 // 100

4.2.2.7.4.1. Consumo de Glucosa y Producción de Etanol

La cuantificación de glucosa remanente a lo largo del proceso fermentativo, tanto para células libres como inmovilizadas, se realizó a través de un análisis espectrofotométrico utilizando un kit enzimático comercial (*Glicemia Enzimática, Wiener Labs.*). El esquema de reacciones es el mismo que el utilizado en la Sección 3.3.1.8.1.

La enzima GOD cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Por estequiometría, la concentración de glucosa en Reacción 4 es proporcional a la de H_2O_2 y este puede detectarse haciéndolo reaccionar con POD y utilizando un indicador colorimétrico para peroxidasa (*quinonimina roja*) con un pico de absorción a 505 nm, la intensidad de color es proporcional a la concentración de glucosa.

Las cantidades utilizadas de reactivo enzimático, muestra y disolvente (agua tri-distilada) fueron 1 mL, 20 μ L, 9 mL respectivamente. El tiempo de reacción, previo al análisis espectrofotométrico fue de 10 min a 37 °C. Las medidas espectroscópicas UV-Vis se realizaron en un espectrofotómetro Hewlett-Packard (HP) modelo 8453 con detector de arreglo de diodos. Se registraron los valores de absorbancias a una longitud de onda de 505 nm. En todos los casos se utilizaron celdas de cuarzo (Hellma Analyses). Los blancos se realizaron con solventes puros (agua, buffer Tris). Para monitorear la producción de etanol (cantidad de etanol producido por unidad de tiempo) se utilizó refractometría (Refractómetro Digital Atago Nar-1T).

4.3. Resultados y Discusiones

4.3.1. Caracterización de Levaduras Inmovilizadas

4.3.2. Microscopía de Barrido Electrónico (SEM)

Las micrografías SEM del hidrogel macroporoso de poliacrilamida 1 M, PAAm-2 se muestran en la Figura 76. Similarmente, las imágenes del hidrogel con levaduras inmovilizadas (PAAm-Sc-6) se presentan en la Figura 77.

Las Figura 76 muestran hidrogeles de poliacrilamida de superficie rugosa con poros interconectados y con una amplia distribución de tamaños de poro que abarca desde 0,1 a 1 micra (Figura 76). Por otro lado, se puede observar en la Figura 77 a-b que las células de levaduras se distribuyen arbitraria y homogéneamente sobre la totalidad de la superficie del hidrogel.

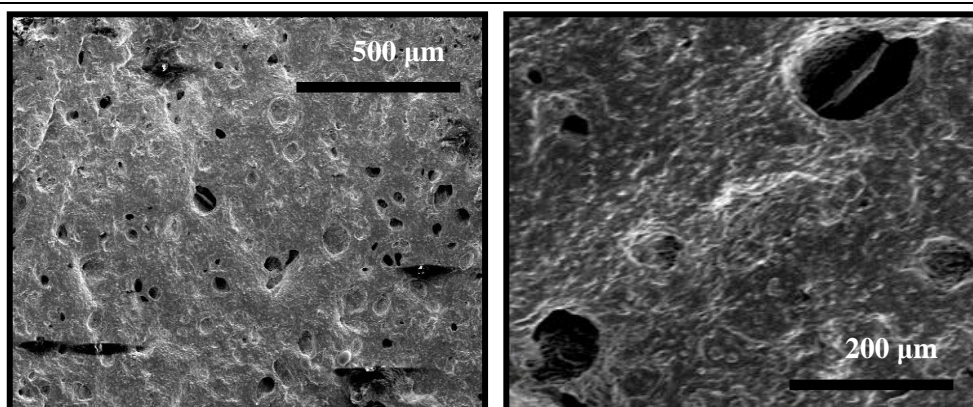


Figura 76: Micrografías SEM de PAAm-2.

El diámetro de las células varía de 2 a 10 micras. En las Figura 77 c-d, los poros presentan un tamaño de 2 o más micras, y en las paredes internas del polímero poros pequeños están presentes, con tamaños que van desde nanómetros a micras. Esta distribución de tamaños de poro posibilita la entrada de nutrientes (glucosa y urea) desde el ambiente externo y la salida de los productos de fermentación (mayormente etanol) hacia el seno de la solución.

Es posible observar en las imágenes (Figura 77 a-b) que existen poros o huecos de tamaño similar al de la levadura, es decir, que la levadura actúa como *template* moldeando el material. Estos espacios, parecen haber sido generados cuando algunas de las levaduras se desprendieron espontáneamente de la matriz polimérica. Asimismo, poros más pequeños parecen evitar la fuga de células más profundamente incorporadas a la red de hidrogel, constituyendo una estructura *jail-like* que permite el confinamiento parcial del componente activo en un espacio definido, sin pérdida completa de movimiento, pero sin restringir su actividad metabólica.

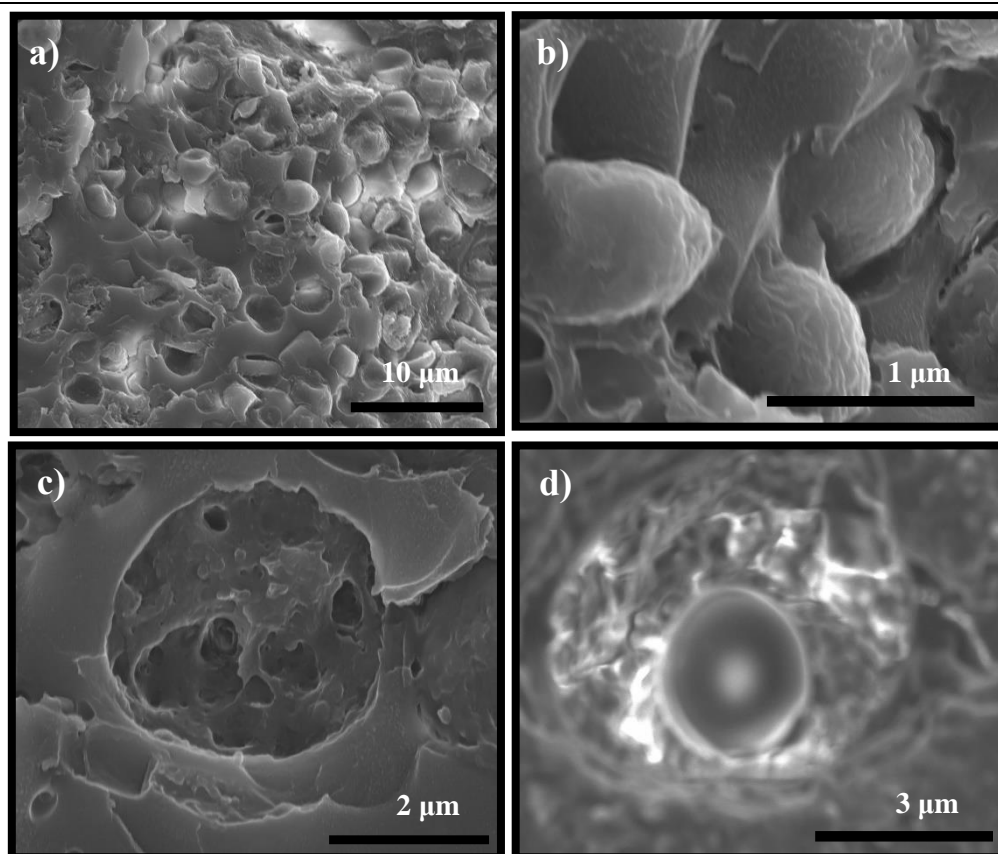


Figura 77: Micrografías SEM de PAAm-Sc-6 a) vista ampliada de superficie del hidrogel b) macroporos c) macroporo sin *S. cerevisiae* d) macroporo con *S. cerevisiae*.

4.3.3. Cinética de Hinchamiento

4.3.3.1. Cinética de Hinchamiento e Hinchamiento en Equilibrio de PAAm-Sc

Para visualizar con mayor claridad el concepto de hinchamiento la Figura 78 ilustra hidrogeles PAAm-Sc-6 en estado deshinchado o seco (Figura 78-a) y en el estado de hinchamiento en equilibrio (Figura 78-b).

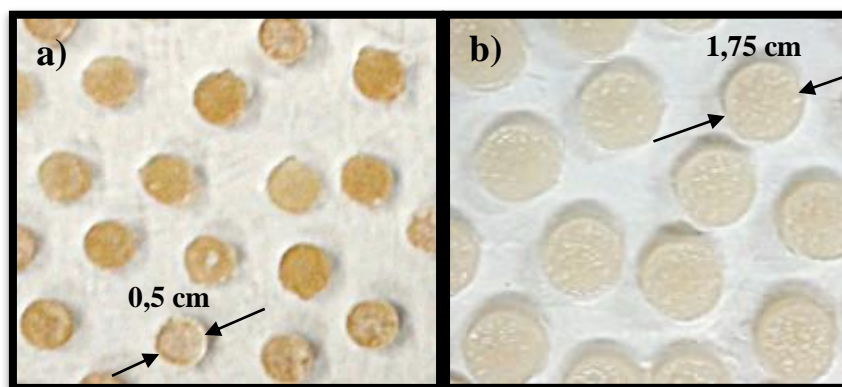


Figura 78: Fotografía PAAm-Sc-6 a) Estado deshidratado b) Hinchamiento de equilibrio

La Figura 79 muestra el perfil de hinchamiento para los hidrogeles de poliacrilamida con y sin levaduras inmovilizadas. Como se observa, las diferentes relaciones de carga celular resultan en perfiles cinéticos de hinchamiento con similar tendencia, pero diferentes características.

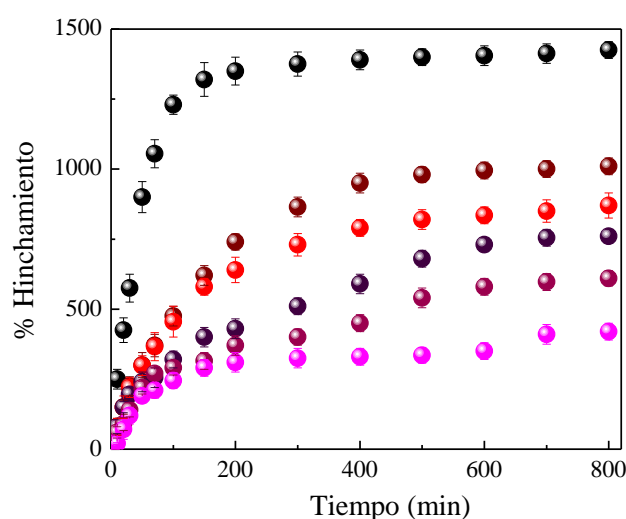


Figura 79: Cinética de hinchamiento para hidrogeles de poliacrilamida 1M. (●) PAAm-2, (●) PAAm-Sc-3, (●) PAAm-Sc-4, (●) PAAm-Sc-5, (●) PAAm-Sc-6, (●) PAAm-Sc-7 en solución acuosa.

En todos los casos, las cinéticas de hinchamiento en función del tiempo exhiben curvas logarítmicas, características de estos hidrogeles. (Martínez *et al.*, 2015) La incorporación de células reduce el espacio inter-poroso de la red del hidrogel, en consecuencia, la velocidad inicial de hinchamiento y el hinchamiento de equilibrio disminuyen, respecto al hidrogel prístino. Como se muestra en la Figura 79 el valor de

hinchamiento de equilibrio en agua pura de un hidrogel PAAm-2 es aproximadamente 1500 %. Los valores de hinchamiento en equilibrio, presentados en la Tabla 20, muestran una disminución exponencial cuando la carga celular aumenta. Este comportamiento podría indicar la presencia de fuertes interacciones atractivas entre las cadenas poliméricas y las levaduras. (Wu *et al.*, 2005)

Tabla 20: Eficiencia de inmovilización e hinchamiento en equilibrio para hidrogeles de poliacrilamida y PAAm-Sc con diferente carga de *S. cerevisiae*.

Material	Carga celular, mg Sc L ⁻¹	% Hinchamiento de equilibrio (*)	Velocidad inicial de hinchamiento, % min ⁻¹
PAAm-2	-	1469 ± 32,5	20,18
PAAm-Sc-3	25	1011 ± 45,0	7,53
PAAm-Sc-4	50	869 ± 26,5	6,55
PAAm-Sc-5	75	758 ± 29,5	4,48
PAAm-Sc-6	175	511 ± 31,5	2,73
PAAm-Sc-7	250	415 ± 15,0	1,50

(*) los valores presentados son el resultado promedio de tres mediciones

4.3.3.2. Capacidad de Hinchamiento de PAAm-Sc en Etanol

En un segundo análisis, los hidrogeles con levaduras inmovilizadas fueron expuestos a diferentes soluciones de agua-etanol para estudiar el comportamiento de estos en un entorno similar (etanol) al de la reacción de fermentación. La exposición de hidrogeles a etanol provoca una disminución notable en las capacidades de hinchamiento, como se observa en la Figura 80.

Cuando la concentración de etanol alcanza un valor crítico, el hidrogel colapsa a un estado más compacto. A concentraciones de etanol de 15 % v/v el hidrogel puro ha perdido el 50 % de su capacidad inicial de hinchamiento y PAA-Sc-6 aproximadamente el 30 %, tal como se muestra en la Figura 80. Para concentraciones de etanol superiores al 50 % v/v, hidrogeles con y sin células no mostraron capacidad de hinchamiento alguna. Por lo tanto, el etanol se comporta como un no-disolvente para las cadenas de poliacrilamida. Cuando un no-disolvente y el agua se mezclan, las moléculas de los disolventes presentan interacciones atractivas que aumentan la energía libre de la cadena polimérica. La afinidad

superior de las cadenas o segmentos del polímero entre sí podría inducir el colapso de la red de polímero.

El hidrogel poliacrilamida sin unidades ionizables, presenta un cambio continuo en la relación de hinchamiento a lo largo de todo el intervalo de concentraciones de etanol. Por otra parte, es bien sabido que *S. cerevisiae* exhibe inhibición alcohólica debido al estrés osmótico bajo concentraciones de etanol superior al 20 % v/v. (Ding *et al.*, 2009) En consiguiente, de acuerdo a los resultados obtenidos, es posible afirmar que el colapso o transición hidrofílica/hidrofóbica del catalizador no se producirá durante la reacción de fermentación. Además, el comportamiento de hidrogel podría contribuir a proteger a las levaduras inmovilizadas de concentraciones de etanol elevadas. De esta manera, el polímero actúa como una barrera de protección que permite la mejora de la viabilidad y la estabilidad de las células durante períodos de tiempo más largos.

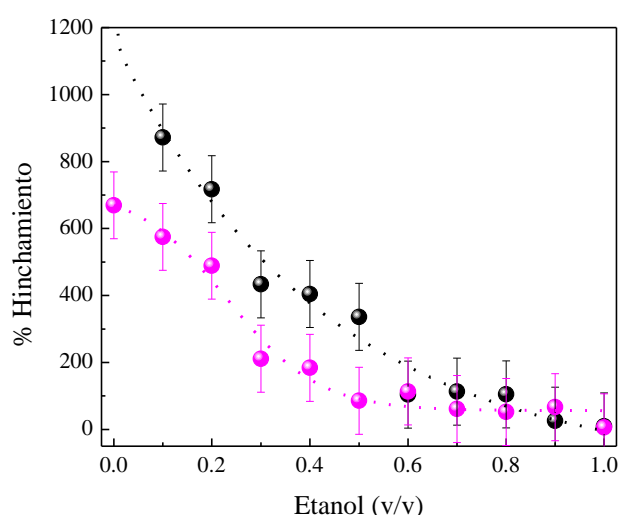


Figura 80: Capacidad de hinchamiento de hidogeles de poliacrilamida en soluciones de agua-etanol. (●) PAAm-2, (●) PAAm-Sc-6.

4.3.4. Eficiencia de Inmovilización Celular

Fue estudiada la eficiencia de inmovilización de levaduras durante el proceso de preparación de PAAm-Sc. La eficiencia de inmovilización fue determinada gravimétricamente utilizando una balanza analítica de $\pm 5 \times 10^{-5}$, análogamente a las experiencias descriptas para inmovilización enzimática en la Sección 3.3.1.1.1. La Tabla 21 muestra los resultados obtenidos. Las células son fuertemente retenidas en las matrices de poliacrilamida, incluso para altas cargas celulares, en todos los casos la eficiencia de inmovilización resultó superior al 97

%, aunque se observa que la eficiencia de inmovilización disminuye para cargas superiores a 175 mg L⁻¹.

Tabla 21: Eficiencia de inmovilización de hidrogeles PAAm-2 y PAAm-Sc con diferente carga celular.

Material	Carga Celular, mg Sc L ⁻¹	Eficiencia de Inmovilización %
PAAm-2	-	-
PAAm-Sc-3	25	> 99,50
PAAm-Sc-4	50	99,50 ± 0,15
PAAm-Sc-5	75	99,10 ± 0,30
PAAm-Sc-6	175	98,80 ± 0,10
PAAm-Sc-7	250	97,25 ± 0,60

4.3.5. Caracterización Mecánica: Análisis Mecánico Estático

La incorporación de levaduras al hidrogel modificó la capacidad de hinchamiento. Por lo tanto, si la estructura del hidrogel sufre una alteración debido a los aumentos en la carga celular, en consecuencia, las propiedades mecánicas podrían también ser modificados.

Los resultados para los ensayos estáticos de elasticidad se muestran en la Tabla 22 y la Figura 81 para de los diferentes geles PAAm-Sc. Para el rango de trabajo experimentado no se llegó en ningún caso a la tensión de ruptura.

Tabla 22: Módulos de elasticidad de hidrogeles PAAm-2 y PAAm-Sc con diferente carga celular.

Material	Módulo de Elasticidad, N m ⁻² (*)	R ²
PAAm-2	13628,70	0,967
PAAm-Sc-3	21868,99	0,967
PAAm-Sc-4	30813,87	0,963
PAAm-Sc-5	34917,08	0,991
PAAm-Sc-6	75453,89	0,985
PAAm-Sc-7	166256,34	0,989

(*) los valores presentados son el resultado promedio de tres mediciones

Los módulos elásticos (E) de hidrogeles PAAm-Sc resultaron mayores que para el hidrogel prístino, lo que concuerda con la disminución en la capacidad de hinchamiento

observada previamente. Asimismo, los incrementos sucesivos de carga celular producen una transición gradual del comportamiento elástico a viscoelástico aumentando el módulo de elasticidad (rigidez del material). Este comportamiento se muestra en la Figura 81 donde se grafica el esfuerzo en función de deformación, cuya pendiente es el módulo de elasticidad.

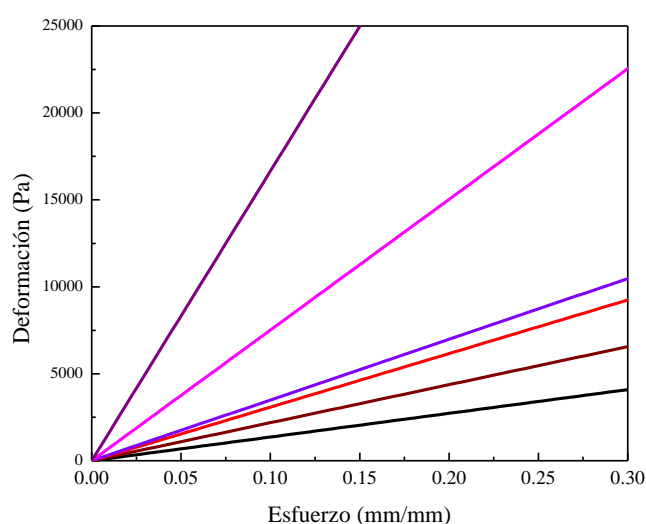


Figura 81: Deformación en función de Esfuerzo para *S. cerevisiae* inmovilizada. (—) PAAm-2, (—) PAAm-Sc-3, (—) PAAm-Sc-4, (—) PAAm-Sc-5, (—) PAAm-Sc-6, (—) PAAm-Sc-7.

4.3.6. Viabilidad Celular

La Figura 82 muestra tres cortes diferentes de hidrogel con levaduras inmovilizadas con diferente carga celular, que corresponden a los materiales PAAm-Sc-7 (a), PAAm-Sc-5 (b) y PAAm-Sc-3 (c). En las micrografías se observa claramente la diferente coloración que adquieren las células según se trate de células vivas (refringentes) o muertas (azules) al ser teñidas con azul de metileno 0,1 M.

La viabilidad celular de levaduras inmovilizadas resultó superior a 80 % para todos los casos en estudio utilizando levaduras inmovilizadas (ver Tabla 23). La densidad media resultó de 2229 células por mm^2 para un gel de carga óptima $0,175 \text{ g Sc mL}^{-1}$ (Figura 82-b). Para el conteo celular de levaduras inmovilizadas se utilizó el software *Motic Image Plus 2.0. L.M.*

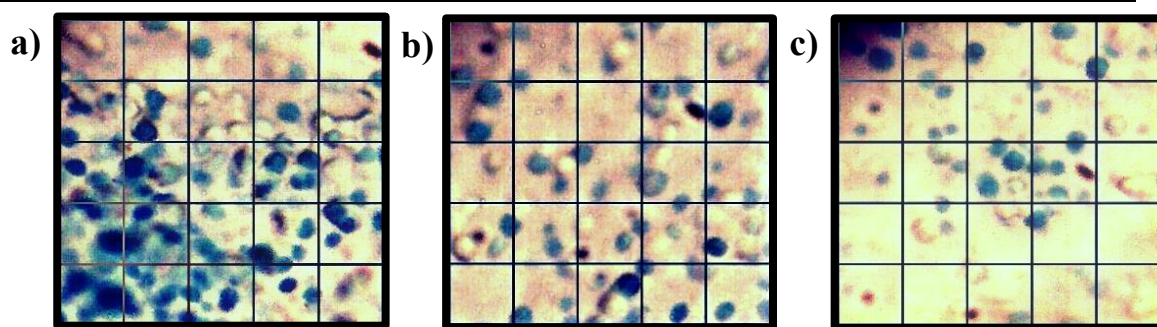


Figura 82: Micrografías de a) PAAm-Sc-7 b) PAAm-Sc-6 c) PAAm-Sc-3. Tinción con azul de metileno. Células azules = Células muertas, Células blancas = Células vivas.

Para el caso de células libres se procedió también mediante tinción con azul de metileno, pero de manera diferente. Tal como se especificó en la Sección **Error! Reference source not found.** se utilizó una cámara de *Neubauer* para el recuento celular. El factor de dilución empleado fue de 1:100 respecto de la concentración de levaduras considerada óptima de $0,175 \text{ g mL}^{-1}$ Sn, esta concentración permite contabilizar una media de 10-15 células (totales) por cuadrícula ($0,2 \mu\text{m} \times 0,2 \mu\text{m}$). Por cada experiencia se contabilizaron seis cuadrículas no consecutivas de la parte superior de la cámara y seis de la parte inferior. El recuento se realizó directamente sobre el microscopio.

Tabla 23: Viabilidad celular para diferentes cargas de levadura *S. cerevisiae* en hidrogeles de poliacrilamida.

Materiales	Células Vivas	Células Muertas	% Células vivas/totales	Área de análisis (μm^2)	Densidad celular Células vivas /área (células/ μm^2)
PAAm-Sc-6	1126	134	89,37	900	2,502
PAAm-Sc-3	398	65	85,98	900	0,885
PAAm-Sc-2	80	13	86,00	900	0,177
<i>S. cerevisiae</i>	80	69	50,31	4800	1,667

(*) Para todos los casos de estudio de levaduras libres fueron diluidas 100 veces para recuento en la cámara de Neubauer, luego la densidad celular se pondera por ese factor de dilución.

Los resultados de la Tabla 23 muestran que para *S. cerevisiae* libres, si bien la densidad superficial es sólo ligeramente menor respecto a PAAm-Sc-6 el porcentaje de células vivas presentes en el medio se distancia aproximadamente en un 20 % respecto al de *S. cerevisiae* libres. Este resultado parece indicar que las levaduras dentro de los geles se encuentran más aglomeradas y a su vez más protegidas del ambiente externo, lo que parece inducir la menor mortalidad celular.

4.3.7. Selección de Matrices de Inmovilización Celular

Una carga de células igual o mayor a 200 g mL^{-1} PGS disminuye la eficiencia de inmovilización, obstruyendo el espacio inter-poroso y acelerando la muerte celular. Con el fin de seleccionar la mejor matriz de inmovilización para los estudios de fermentación fueron empleados los siguientes criterios:

- Elevada eficiencia de inmovilización
- Alta viabilidad celular (superior a 80 %)
- Bajo módulo de Young (elevada elasticidad)

Teniendo en cuenta estos criterios, la PAAm-Sc-6 es la matriz seleccionada.

4.3.8. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Termogravimetría (TGA)

Se realizaron análisis de DSC y TGA en levaduras inmovilizadas (PAAm-Sc-6) e hidrogeles prístinos para continuar estudiando el efecto de confinamiento de las levaduras dentro de la red entrecruzada del hidrogel. La Figura 83 muestra los termogramas DSC obtenidos para los hidrogeles de poliacrilamida con las características banda de solidificación (hacia abajo) y de fusión (hacia arriba) asociadas con el agua que contenida en la matriz. (Nesrinne y Djamel, 2013) En general, estos estados del agua representan entre el 90-97 % del total de agua del hidrogel. La carga celular podría influir en la diferencia de temperaturas entre los dos picos, probablemente debido a la interacción preferencial del agua en cada muestra. Este desplazamiento de pico podría ser evidencia de una interacción específica levadura-matriz, que se distingue de la de la matriz pura.

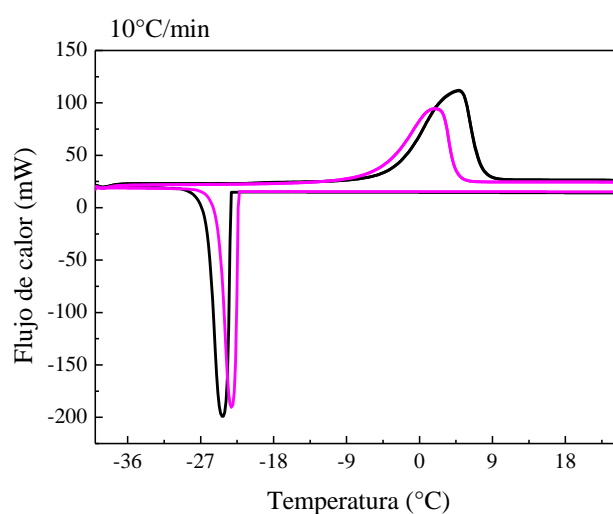


Figura 83: Calorimetría diferencial de barrido para hidrogeles de acrilamida puros, (-) PAAm y con levaduras inmovilizadas (-) PAAm-Sc-4 Velocidad $10 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

Los datos PAAm-Sc-6 y PAAm TGA se presentan en la Figura 84 también están representados la primera derivada de la pérdida de peso. Los perfiles de TGA se construyeron como una función de la temperatura a una velocidad de calentamiento de 10 °C min⁻¹.

Los ensayos de TGA informan sobre la pérdida de masa del material, la cual ocurre en las tres etapas de descomposición características de hidrogel de poliacrilamida para ambos casos en estudio.(Al-Sabagh *et al.*, 2013)(Menczel y Prime, 2008) La etapa inicial de la pérdida de peso se produjo entre 50 °C y 200 °C, está asociada a la evaporación del agua intra e inter-molecular, y posiblemente, otros compuestos volátiles, proteínas e hidratos de carbono de la levadura. La pérdida de peso asociada a esta etapa fue de 10 % del peso total.(Al-Sabagh *et al.*, 2013) Los hidrogeles de poliacrilamida contienen grupos hidrofílicos, que podrían inducir al material a interactuar con moléculas de agua. La segunda etapa se produjo en el rango de 210 a 330 °C, dando como resultado una pérdida de peso de 22 %, que se relaciona con la reacción de la imina de un pequeño número de los grupos amida y la descomposición térmica de las cadenas laterales hidrofóbicas del hidrogel.(Al-Sabagh *et al.*, 2013) La tercera etapa ocurre en el rango de 350 a 500° C y representa una pérdida de peso de aproximadamente 55 %. Esta corresponde a la descomposición de grupos amida y la degradación de las cadenas principales de polímero. Más allá de esta temperatura, el polímero se descompone completamente. Este estudio sugiere que la estabilidad térmica del hidrogel fue ligeramente mejorada con la adición de células; debido a que no hay diferencias sustanciales entre el comportamiento pirolítico de hidrogel con y sin levadura.

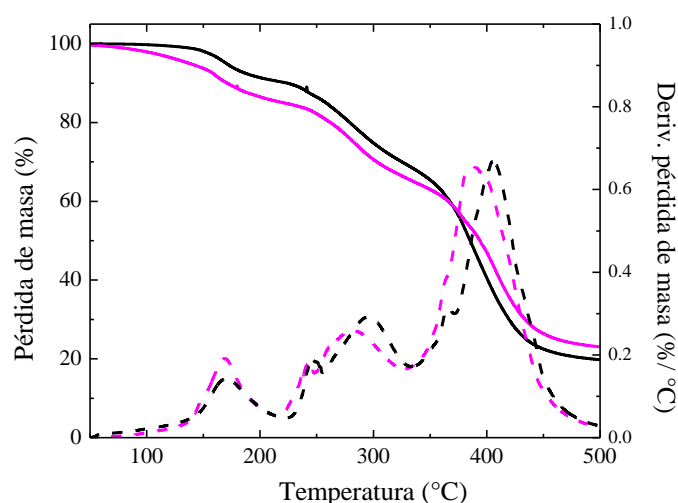


Figura 84: Termograma TGA (-) PAAm-2 y (-) PAAm-Sc-6. % Pérdida de masa (línea continua). Derivada primera % pérdida de masa (línea de puntos).

4.3.9. Reacción de Fermentación

4.3.9.1. Parte I: Ciclos Breves de Fermentación

4.3.9.1.1. Influencia de la Temperatura sobre la Eficiencia de Fermentación

Durante los ciclos de fermentación de 120 min se midió la producción de etanol monitoreando la formación de dióxido de carbono, tal y como se detalló en la Sección 4.2.2.7.1.1. La Figura 85 a-b muestra los resultados para las Experiencias con los sistemas 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19 y 22 de la Tabla 13. La

Tabla 24 adjunta a la figura resume las condiciones de operación y muestra los resultados finales obtenidos respecto a rendimiento teórico final de etanol calculado a través de la Ecuación 14 y el tiempo transcurrido hasta alcanzar este rendimiento máximo.

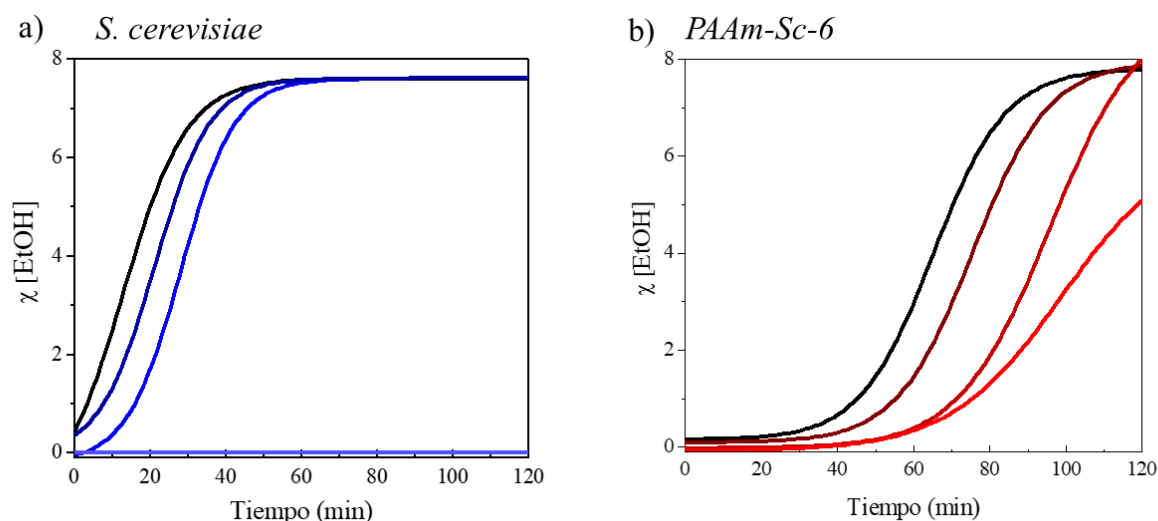


Figura 85: Análisis de la temperatura de reacción. Ciclos cortos de fermentación para a) *S. cerevisiae* (---) 42 °C, (---) 45 °C, (---) 50 °C y (---) 65 °C b) PAAm-Sc-6 (---) 42 °C, (---) 45 °C, (---) 50 °C y (---) 65 °C en función del rendimiento de etanol.

Como se observa en la Figura 85 para todos los casos estudiados, la reacción de fermentación parece estar gobernada más fuertemente por factores de estrés por calor sufrido por los catalizadores que por la cinética de la reacción (incremento de la temperatura en una reacción exotérmica). Comparando la reacción a 42 °C para levaduras libres e inmovilizadas, se observa que las levaduras libres poseen una velocidad inicial de reacción mayor. Además, en el caso de PAAm-Sc-6 se evidencia un periodo de latencia de no-producción de etanol.

Tabla 24: Análisis de la temperatura de reacción. Resultados de ciclos de fermentación de etanol a partir de glucosa con *S. cerevisiae*. Para todos los casos: pH 7,2 y glucosa inicial 3 % p/v.

Material	N° Exp.	[Inóculo] ₀ , g Sc mL ⁻¹ // Uds. (*)	Temp., °C	χ [EtOH]	Tiempo χ [EtOH] _{max} , min
<i>S. cerevisiae</i>	1	4 x 10 ³	42	7,56	33,3
	4	4 x 10 ³	45	7,56	38,9
	7	4 x 10 ³	50	7,56	48,15
	10	4 x 10 ³	65	0,0	-
PAAm-Sc-6	13	175 // 100	42	7,56	83,3
	16	175 // 100	45	7,56	93,1
	19	175 // 100	50	7,56	109,8
	22	175 // 100	65	5,9	111,8

(*) Uds. = cantidad de pastillas de hidrogel con catalizador.

4.3.9.1.2. Influencia de la Concentración Inicial de Glucosa sobre la Eficiencia de Fermentación

Respecto a la concentración inicial de glucosa, se muestran a continuación los resultados para las experiencias (Ver Tabla 13) realizadas con los sistemas 1, 2 y 3 para levaduras libres y 13,14 y 15 para PAAm-Sc-6 en las Figura 86-a y b, respectivamente. La Tabla 25 resume las condiciones de operación y muestra los resultados finales obtenidos respecto al rendimiento teórico de etanol (Ver Ecuación 14) alcanzado para 120 min de operación.

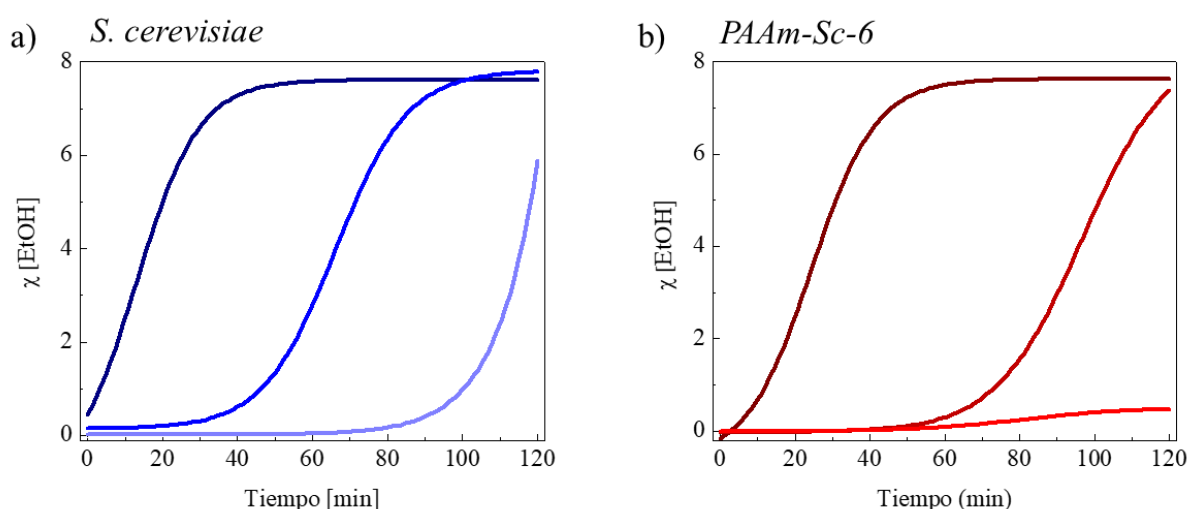


Figura 86: Análisis de la concentración inicial de glucosa. Ciclos cortos de fermentación para a) *S. cerevisiae* con $[glucosa]_0$ (---) 3 % p/v, (---) 10 % p/v, (---) 15 % p/v b) PAAm-Sc-6 (---) 3 % p/v, (---) 10 % p/v, (---) 15 % p/v.

Analizando la influencia de la concentración inicial de glucosa sobre la producción de etanol, se observa que tanto levaduras libres como inmovilizadas mantienen su actividad catalítica constante cuando se triplica la concentración de azúcar en el medio de reacción. No obstante, se observan bajas velocidades iniciales de reacción para PAAm-Sc-6 en comparación de levaduras libres. Esto podría deberse a razones difusivas, a un necesario periodo de aclimatación a las condiciones de estrés osmótico, o en el caso de PAAm-Sc-6 a una combinación de ambos fenómenos. Para una concentración inicial de glucosa de 15 % p/p de glucosa inicial, *S. cerevisiae* se vuelven mantienen activas, sin embargo PAAm-Sc-6 pierden parcialmente su actividad.

Puede advertirse que existe una concentración inicial de glucosa óptima que favorece la velocidad de reacción y disminuye los tiempos de fermentación, sin ocasionar inhibición por estrés osmótico. En la sección siguiente (Sección 4.2.2.7.4), fue analizado este comportamiento en forma detallada. Las experiencias con los sistemas 4-9 y 16 -22 arrojan resultados similares a los observados en las Figura 86 y por simplicidad no se muestran en la figura. No obstante, la Tabla 25 presenta los resultados para todas las experiencias realizadas.

La reacción de fermentación parece impulsarse en mayor grado por el aumento en la concentración inicial de glucosa que por el aumento de temperatura. Esto se condice con la premisa exhibida de que la reacción de fermentación no parece estar influenciada marcadamente por aumentos en la temperatura.

Tabla 25: Análisis de concentración de glucosa inicial Resultados de ciclos cortos de fermentación de etanol utilizando *S. cerevisiae*.

Material	N° Exp.	[Glucosa] ₀ , p/v	pH	[Inóculo] ₀ , g Sc mL ⁻¹ // Uds (*)	Temp., °C	χ [EtOH]	Tiempo χ[EtOH] _{max}
<i>S. cerevisiae</i>	1	3	7,2	4 x 10 ³	42	7,56	33,3
	2	10	7,2	4 x 10 ³	42	7,56	84,7
	3	15	7,2	4 x 10 ³	42	0,48	120
	4	3	7,2	4 x 10 ³	45	7,56	33,3
	5	10	7,2	4 x 10 ³	45	7,56	85,1
	6	15	7,2	4 x 10 ³	45	0,00	120
	7	3	7,2	4 x 10 ³	50	7,56	48,15
	8	10	7,2	4 x 10 ³	50	7,56	85,9
	9	15	7,2	4 x 10 ³	50	0,00	120
PAAm-Sc-6	13	3	7,2	0,175 // 100	42	7,56	44,6
	14	10	7,2	0,175 // 100	42	7,56	117,75
	15	15	7,2	0,175 // 100	42	5,85	120
	13	3	7,2	0,175 // 100	45	7,56	44,6
	14	10	7,2	0,175 // 100	45	7,56	117,75
	15	15	7,2	0,175 // 100	45	5,80	120
	13	3	7,2	0,175 // 100	50	7,56	44,6
	14	10	7,2	0,175 // 100	50	7,56	117,75
	15	15	7,2	0,175 // 100	50	5,76	120

(*) Uds. = cantidad de pastillas de hidrogel con catalizador.

4.3.9.1.3. Influencia de Efectos Difusionales

La eficiencia de producción en función de las distintas cargas de levaduras para PAAm-Sc fue examinada como se explicó en la Sección 4.2.2.7.1.2. En la Tabla 26 (de acuerdo con las experiencias detalladas en la Tabla 13) se resumen los resultados alcanzados.

Tabla 26: Condiciones experimentales para fermentación de etanol a partir de glucosa utilizando diferentes cargas *S. cerevisiae* en hidrogeles. Condiciones de reacción: 42°C; pH 7,2; 3 % p/v.

Materiales	N° Exp.	[Inóculo] ₀ (mg Sc mL ⁻¹) // Uds. (*)	χ [EtOH]	Tiempo χ [EtOH] _{max}
PAAm-Sc-1	25	50 // 250	7,56	56
PAAm-Sc-4	26	75 // 167	7,56	51
PAAm-Sc-6	27	175 // 100	7,56	45
PAAm-Sc-7	28	500 // 50	7,56	33,3

(*) Uds. = cantidad de pastillas de hidrogel con catalizador.

En todos los casos el rendimiento final alcanzado de etanol es el mismo (Ver Tabla 26). Sin embargo el tiempo requerido hasta alcanzar ese rendimiento difiere entre una carga y otra, existiendo un tiempo mínimo que corresponde a una carga de levaduras de: 0,175 g mL⁻¹. Este resultado sugirió esta carga de levadura como la óptima manteniendo una elevada producción de etanol y minimizando problemas difusionales.

4.3.9.1.4. Influencia del Área Superficial

Fue analizada la eficiencia de producción en función del área superficial de PAAm-Sc-6, como se explicó en la Sección 4.2.2.7.1.3. Los resultados se muestran en Tabla 27 y de acuerdo con las experiencias detalladas en la Tabla 13.

Tabla 27: Condiciones experimentales para fermentación de etanol a partir de glucosa utilizando diferentes morfologías *S. cerevisiae* en hidrogeles. Condiciones de reacción: 42°C; pH 7,2; 3 % p/v.

Material	N° Exp.	Morfología discos	[Inóculo] ₀ (mg Sc mL ⁻¹) // Uds. (*)	χ [EtOH]	Tiempo χ [EtOH] _{max}
PAAm-Sc-6	29	d = 0,5 cm	175 // 100	7,56	33,3
PAAm-Sc-9	30	d = 0,7 cm	175 // 100	7,56	37

(*) Uds. = cantidad de pastillas de hidrogel con catalizador.

Es ampliamente conocido el efecto favorecedor del aumento del área superficial en la velocidad de reacción. Para todos los casos analizados el rendimiento final alcanzado de etanol es el mismo, sin embargo el tiempo requerido hasta alcanzar ese rendimiento difiere ligeramente entre una morfología y otra. Este resultado sugirió la implementación de cápsulas discoidales de 0,5 cm de diámetro (en estado hidratado) como matriz de inmovilización para la reacción de fermentación a tiempo de reacción industrial.

4.3.9.2. Análisis de la Concentración de Etanol Producido por Fermentación

De acuerdo a lo mencionado en la Sección 4.3.9.2 se analizó la influencia sobre el sistema del incremento en la concentración de etanol y el tiempo de exposición al mismo, la tabla de resultados Tabla 28.

Tabla 28: Análisis de la tolerancia a exposición de etanol y tiempo de exposición a etanol. Condiciones de análisis: 42°C; pH 7,2; 3 % p/v.

Material	N° Exp.	[EtOH], % pv	t _{exp} , min	Cantidad Inicial, g	χ [EtOH] 120 min	Tiempo χ final
<i>S. cerevisiae</i>	40	14	10	1 x 10 ⁻⁴	7,56	33,3
	41	14	30	1 x 10 ⁻⁴	7,56	33,35
	42	14	60	1 x 10 ⁻⁴	7,56	33,5
	43	21	10	1 x 10 ⁻⁴	7,56	68
	44	21	30	1 x 10 ⁻⁴	7,56	68
	45	21	60	1 x 10 ⁻⁴	6,80	75,5
	46	96	10	1 x 10 ⁻⁴	-	-
	47	96	30	1 x 10 ⁻⁴	-	-
	48	96	60	1 x 10 ⁻⁴	-	-
<i>PAAm-Sc-6</i>	49	14	10	0,175 // 10	7,56	45
	50	14	30	0,175 // 10	7,56	45,5
	51	14	60	0,175 // 10	7,56	45,5
	52	21	10	0,175 // 10	7,56	72
	53	21	30	0,175 // 10	7,56	76
	54	21	60	0,175 // 10	7,56	76
	55	96	10	0,175 // 10	-	-
	56	96	30	0,175 // 10	-	-
	57	96	60	0,175 // 10	-	-

Tanto las levaduras libres como inmovilizadas inhiben su actividad catalítica para altas concentraciones de etanol, sin embargo estudios posteriores (no mostrados en la tabla) manifiestan actividad parcial hasta concentraciones de etanol de 36 % p/v. A 21 % p/v de etanol puede observarse nuevamente el efecto “protector” del hidrogel, que mantiene, al menos temporalmente, actividad catalítica de las levaduras, pero disminuyendo la velocidad de reacción.

4.3.9.3. Parte II: Análisis del Proceso de Fermentación a Tiempo Industrial

El proceso de fermentación de etanol depende de muchos factores, tales como, cantidad glucosa inicial y concentración de inóculo, tiempo y temperatura de reacción (Nikolić *et al.*, 2009) Se realizaron cinco ciclos de reacción de fermentación consecutivos. El primer conjunto de experimentos (primer ciclo) se llevó a cabo con el fin de comparar el comportamiento de levaduras libres e inmovilizadas. El recuento de células de levadura pre-hidratadas, antes de la polimerización arrojó un resultado de $3,6 \times 10^5$ células mL⁻¹. La concentración inicial de glucosa fue de 0,30 g mL⁻¹, la temperatura se fijó a 42 °C y la agitación se mantuvo constante 250 rpm. La fermentación se llevó a cabo durante 90 h. Los datos de concentraciones de etanol y glucosa obtenidos a diferentes tiempos se presentan en la Tabla 29, datos que corresponden a la cinética muestran en las Figura 87 y Figura 88.

Tabla 29: Primer ciclo de fermentación de PAAm-Sc-6. Condiciones iniciales: 1 g de *S. cerevisiae* (100 cápsulas), 0,30 g 100 mL⁻¹ de glucosa inicial, 42 °C, 250 rpm.

	Tiempo de operación, h	Concentración etanol, % p/p	Concentración glucosa, p/p	Rendimiento de etanol, g g ⁻¹	% Rendimiento teórico de etanol %	Productividad g (L. h) ⁻¹
<i>S. cerevisiae</i>	26	6,17 ± 0,50	0,300 ± 0,01	24,68 ± 0,50	40,45	2,37
	38	7,86 ± 0,50	0,280 ± 0,01	31,44 ± 0,50	51,54	2,07
	54	8,36 ± 0,25	0,156 ± 0,02	33,44 ± 0,50	54,82	1,49
	76	6,99 ± 0,50	0,026 ± 0,01	27,96 ± 0,50	45,83	0,95
PAAm-Sc-6	26	5,38 ± 0,30	0,300 ± 0,01	21,52 ± 0,50	35,27	2,07
	38	6,93 ± 0,50	0,255 ± 0,01	27,72 ± 0,50	45,44	1,82
	54	8,31 ± 1,50	0,100 ± 0,01	33,24 ± 0,50	54,49	1,48
	76	8,39 ± 1,50	0,016 ± 0,01	33,56 ± 0,50	55,01	1,13

Durante el primer ciclo de fermentación, para levaduras libres e inmovilizadas, las curvas muestran la línea de tiempo de fermentación típica para una reacción discontinua o batch, que se caracteriza por tres fases principales: fase de latencia, fase de crecimiento exponencial y fase estacionaria (Figura 87 y Figura 88). (Fan *et al.*, 2015) Con respecto al primero ciclo de fermentación de levaduras libres, como se muestra en la Figura 87, el consumo de azúcar fue casi completo luego de 60 h y el rendimiento de etanol alcanzó el nivel máximo de 9,85 % w/w, después de 50 h de fermentación. Para levaduras inmovilizadas, el máximo rendimiento de etanol (8,39 % w/w) se alcanza en un tiempo similar y el consumo completo de la glucosa tarda más tiempo (Véase la Figura 88), probablemente a velocidades de difusión inferiores.

Después de 60 h de reacción para levaduras libres, se observa una reducción del rendimiento de alcohol, Thatipamala *et al.*, ha informado que durante este tipo de reacción batch, problemas asociados al estrés en levaduras por inhibición alcohólica afectan considerablemente el rendimiento del sistema y consecuentemente la formación de etanol (Thatipamala, Rohani y Hill, 1992). Del mismo modo, Siqueira *et al.*, informaron que altas concentraciones de sustrato inhiben el crecimiento y la fermentación de la levadura durante la producción de etanol a partir de melazas de soja en un sistema por lotes. (Siqueira *et al.*, 2008) Este comportamiento puede atribuirse a efectos de inhibición causados por la exposición prolongada de las células a alta concentraciones de etanol.

Los datos obtenidos son ampliamente consistentes con el hecho que después del primer ciclo de reacción, la viabilidad células libres disminuyó en un 5 %. Estos inconvenientes (estrés levadura, mortalidad y disminución de rendimiento de etanol) parecen ser menos importante para las levaduras inmovilizadas, que no muestran una disminución del rendimiento de etanol o de la viabilidad celular. Una explicación de estos resultados podría estar relacionada con las características de la matriz polimérica porosa, que permite el confinamiento y protección de levaduras y disminuye la concentración efectiva de alcohol en contacto con las levaduras. De este modo, una menor concentración de etanol está en contacto con la levadura, lo que reduce el factor de estrés que causa la inhibición osmótica.

Limitaciones de transporte de masa retardan el inicio de la reacción química de fermentación y, en consecuencia, la velocidad de reacción inicial de producción de etanol fue menor para PAAm-Sc-6 que para levaduras libres. Después del primer ciclo de fermentación, las levaduras libres se extraen del medio de reacción, se centrifugan y se

incorporan en un medio de reacción nuevo para iniciar un segundo ciclo de reacción. Las levaduras inmovilizadas fueron eliminadas mecánicamente del reactor y fueron incorporadas levaduras nuevas al reactor. Los resultados se muestran en la Figura 89 a, b) para la *S. cerevisiae* libre e inmovilizada.

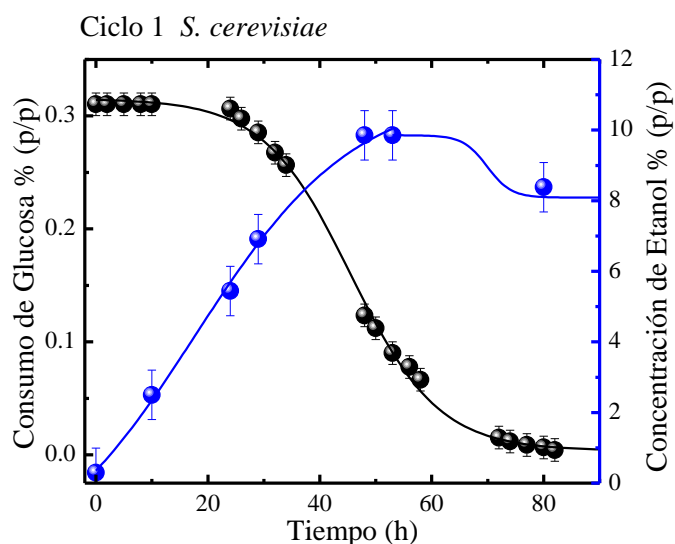


Figura 87: Primer ciclo de fermentación para *S. cerevisiae* libres, (-) Consumo de glucosa (izq.), (-) Concentración de etanol producida (der.).

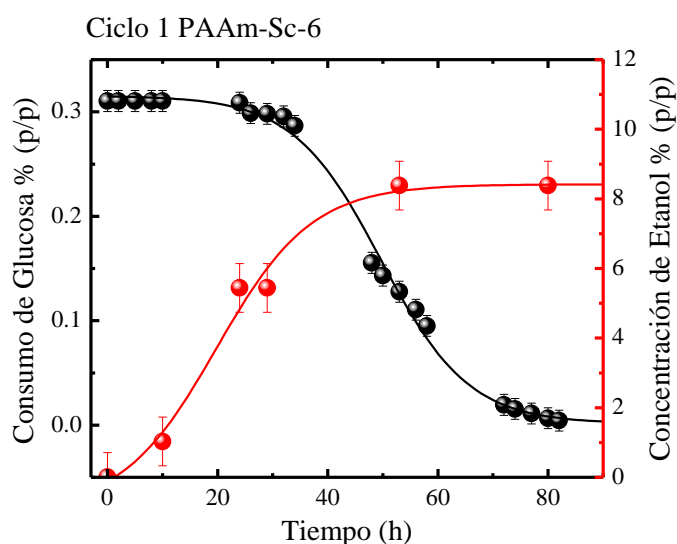


Figura 88: Primer ciclo de fermentación para PAAm-Sc-6, (-) Consumo de glucosa (izq.), (-) Concentración de etanol producida (der.).

Después de 80 h de operación, levaduras libres consumen sólo el 8 % de la glucosa inicial y la concentración de etanol es inferior a 3 %. Mientras que, para el sistema

inmovilizado (PAAm-Sc-6) la totalidad de la glucosa inicial fue consumida y la concentración de etanol alcanzó un rendimiento del 11 %. Esta tendencia se hace más pronunciada durante el tercer ciclo de operación, donde las células de levadura libres muestran total inactividad para producir etanol o consumir glucosa (Figura 89 c, d).

Por otro lado, las levaduras inmovilizadas reutilizadas muestran una tendencia similar en todos los ciclos de reacción, aunque se observa una reducción parcial de la concentración de etanol en el tercer y cuarto ciclo. Por lo tanto, y con el objetivo de mejorar la producción hasta valores normales, se añadió una inyección de glucosa adicional de 10 g L⁻¹ para el cuarto lote de fermentación de levadura inmovilizada.

Además de mejorar el rendimiento, la naturaleza monolítica del hidrogel con células entrampadas hace al retiro del biocatalizador de la solución un procedimiento sencillo, especialmente cuando se compara con una suspensión de levadura libre. Adicionalmente, la superficie exterior de la cápsula de hidrogel podría ser esterilizada para eliminar la contaminación bacteriana, viral o fúngica que permitiría volver a utilizarlas sin riesgo de contaminación alguno.

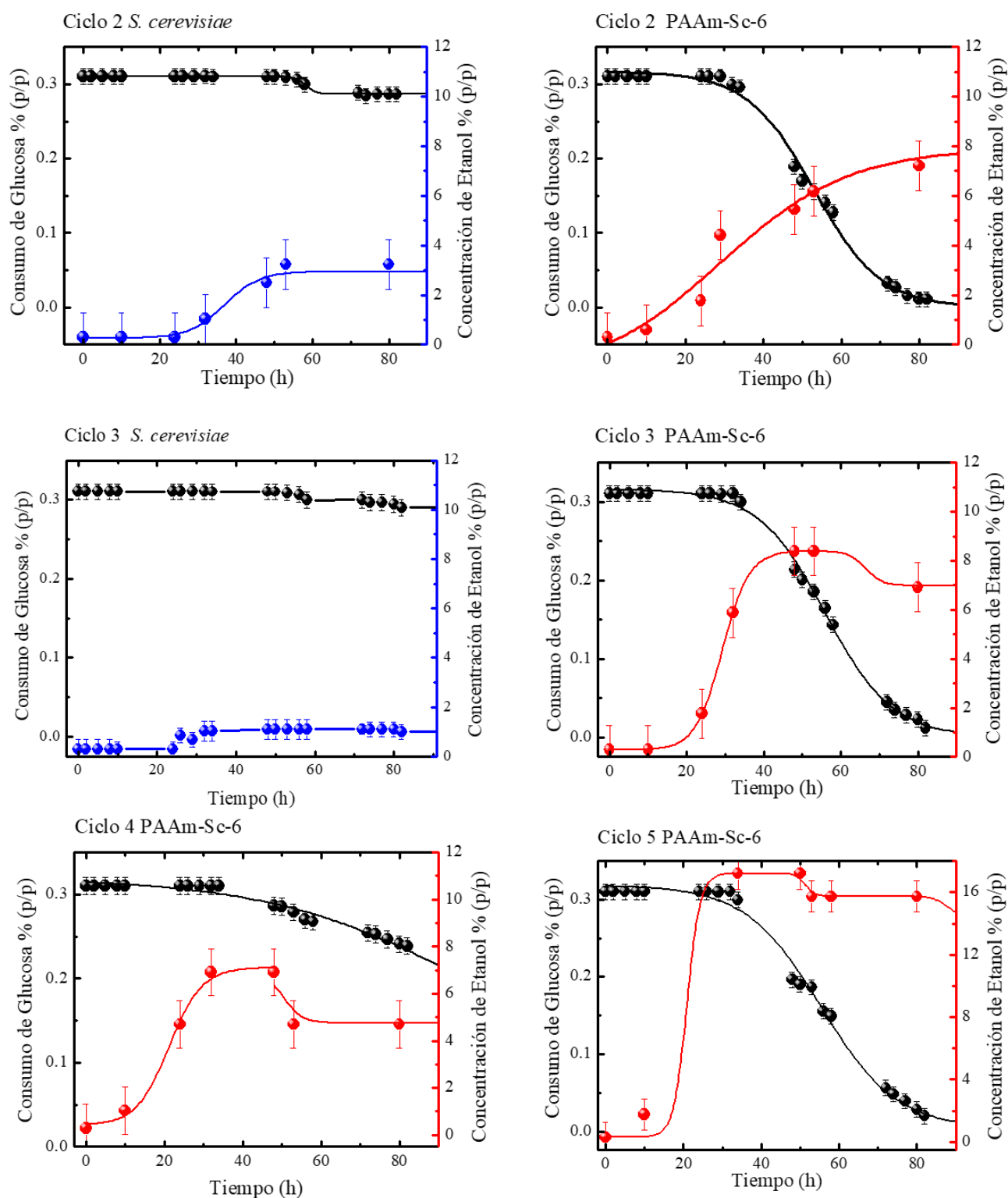


Figura 89: Ciclo 2 de fermentación para a) *S. cerevisiae* libre b) PAAm-Sc-6. Ciclo 3 c) *S. cerevisiae* libre d) PAAm-Sc-6. e) Ciclo 4 PAAm-Sc-6 f) Ciclo 5 PAAm-Sc-6. Para levaduras libres e inmovilizadas. Consumo de glucosa (izq.). (PAAm-Sc-6, *S. cerevisiae*) Concentración de etanol producida (der.).

La levadura inmovilizada responde favorablemente al aumento de concentración inicial de glucosa y muestra actividad catalítica completa. Las levaduras son microorganismos que necesitan de carbono y nitrógeno para el crecimiento, respiración y reproducción. Probablemente, la escasez de fuente de carbono (glucosa), los ciclos de fermentaciones continuos y la exposición constante a etanol actúan negativamente y, por lo tanto, el rendimiento de etanol parcialmente disminuye al aumentar el número de ciclos (tercer y cuarto ciclo).

Varios autores informaron que en el sistema de fermentación por lotes para *S. cerevisiae* inmovilizada, el rendimiento de etanol depende fuertemente de la concentración inicial de glucosa (Solis-Pereyra *et al.*, 1996)(Najafpour, Younesi y Ku Ismail, 2004)(Tronchoni *et al.*, 2009). Sin embargo, la inhibición de sustrato se observó a concentraciones muy altas de glucosa inicial (por encima de 30 %). Para los ciclos 4 y 5 de levaduras inmovilizada (Figura 89 d, f) se modificaron las condiciones. La reacción se lleva a cabo a la misma temperatura, pero bajo una concentración de glucosa inicial más alto (10 %). Cuando la cantidad de azúcar es 10 % presenta el mismo perfil que cuando la cantidad de azúcar es 3%, sin embargo, es posible alcanzar productividades más elevadas (ver Tabla 30).

Tabla 30: Ciclos de fermentación de la levadura libre e inmovilizada (PAAm-Sc-6), Los valores máximos de etanol producido y la concentración de glucosa consumida, el rendimiento de etanol, y el porcentaje de etanol rendimiento teórico y la productividad volumétrica, Los ciclos iniciales 1, 2, 3: 1 g *S. cerevisiae* (100 Uds.), 30 g L⁻¹ de glucosa, 42 ° C, 250 rpm, Ciclos 4: 100 g L⁻¹ de glucosa, Ciclos 5: 150 g L⁻¹ de glucosa.

Material	Ciclo	Glucosa inicial, % (p/p)	Etanol, % (p/p)	Glucosa, g L ⁻¹	η Etanol, g g ⁻¹	% η teórico	Productividad, g (L.h) ⁻¹
PAAm-Sc-6	1	3	8,34 ± 1,50	0,036 ± 0,01	33,36	50,55	1,26
	2	3	7,69 ± 1,50	0,000 ± 0,01	30,76	46,61	0,85
	3	3	8,31 ± 1,50	0,185 ± 0,02	33,24	50,36	1,54
	4	10	7,12 ± 2,00	1,010 ± 0,05	28,48	43,15	1,51
	5	15	15,66 ± 5,5	0,490 ± 0,05	62,64	94,91	2,45
<i>S. cerevisiae</i>	1	3	9,94 ± 2,5	0,069 ± 0,05	39,76	65,18	1,84
	2	3	2,95 ± 2,5	0,286 ± 0,05	11,80	19,34	0,45
	3	3	0,00 ± 2,5	0,000 ± 0,01	0,00	0,00	0,00

Tabla 31: Análisis de viabilidad celular para ciclos de fermentación de la levadura libre e inmovilizada (PAAm-Sc-6). Los ciclos iniciales 1, 2, 3: 1 g *S. cerevisiae* (100 Uds.), 30 g L⁻¹ de glucosa, 42 ° C, 250 rpm, Ciclos 4: 100 g L⁻¹ de glucosa, Ciclos 5: 150 g L⁻¹ de glucosa

Material	Ciclo	Células Vivas	Células Muertas	% Células vivas/totales	Área de análisis (μm ²)	Densidad celular Células vivas /área (células μm ⁻²)
PAAm-Sc-6	1	1126	134	89,37	900	2,502
	2	991	161	86,02	900	2,202
	3	959	103	88,14	900	2,131
	4	956	180	84,15	900	2,201
	5	947	208	81,99	900	2,105
<i>S. cerevisiae</i>	1	80	69	50,31	4800	1,667
	2	99	61	61,88	4800	2,063
	3	95	78	54,91	4800	1,979
	4	99	81	55,00	4800	2,063
	5	94	65	59,12	4800	1,958

4.4. Conclusiones Parciales

Para la inmovilización de levaduras *S. cerevisiae* se utilizaron hidrogeles macroporosos de poliácridamida sintetizados mediante crio-polimerización. La carga óptima de levaduras que fue posible incorporar al hidrogel resultó ser de 175 mg Sc mL⁻¹ sn. El resultado se obtuvo analizando criterios de eficiencia de inmovilización, análisis del comportamiento mecánico, viabilidad celular (> 80 %) y análisis de la capacidad de hinchamiento.

Respecto al proceso de producción de bioetanol, mediante el análisis de experiencias fermentativas (ciclos breves de fermentación) fue analizado el comportamiento de levaduras frente a cambios en las condiciones de reacción. El análisis de la temperatura de operación mostró que PAAm-Sc logra soportar activamente hasta una temperatura de trabajo de 60 °C, 10 °C superior a la máxima temperatura soportada por *S. cerevisiae* libres, durante dos horas de operación. En cuanto a la concentración inicial de azúcar tanto levaduras libres como inmovilizadas respondieron positivamente frente a cambios en la concentración inicial de glucosa. Levaduras inmovilizadas también demostraron mayor tolerancia a estrés osmótico debido a la exposición de las mismas a

altas concentraciones de etanol, aunque por periodos limitados de tiempo. Estos resultados antedichos son muy ventajosos en procesos industriales donde fluctuaciones en las variables operativas ocurren usualmente durante los ciclos de operación.

El análisis de ciclos de fermentación a escala industrial (96 h de operación) arrojaron resultados muy alentadores, ya que los catalizadores inmovilizados presentan la posibilidad operativa de ser reutilizadas en hasta cinco ciclos de reacción probados y sin disminuir el rendimiento de etanol. Por lo tanto la utilización de biocatalizadores inmovilizados podría implicar una reducción de costos en insumos industriales de hasta un 30 %. Como contrapartida, el proceso fermentativo es inicialmente más lento cuando se emplean biocatalizadores inmovilizados, incrementándose la fase *lag* de las levaduras; sin embargo los rendimientos finales de etanol son los mismos.

5. Inmovilización Simultánea de Enzimas y Levaduras

5.1. Introducción

Hasta el momento hemos analizado como las concentraciones y productividades finales de etanol pueden ser radicalmente mejorados mediante la incorporación de biocatalizadores inmovilizados al sistema de reacción de producción de etanol. Durante los capítulos previos de esta tesis doctoral se trabajó con cada sustrato catalítico por separado, se analizó la cinética de la reacción, se determinó la mejor carga tanto celular como enzimática para la matriz de inmovilización y se estudió su potencial reusabilidad.

Como capítulo final de esta tesis doctoral se exponen las reacciones de obtención de bioetanol a partir de almidón: licuefacción, sacarificación y fermentación ensayadas con hidrogeles esféricos utilizando una matriz tri-componente con levaduras, enzimas α -amilasa y β -amilasa inmovilizadas y operando como un proceso *one-pot*.

Para estudiar y optimizar este proceso se utilizó un análisis estadístico de datos experimentales denominado Diseño de Experimentos (*Desing of Experiments, DoEs*), para definir las condiciones experimentales óptimas que maximizan la producción de etanol.

5.1.1. Reacciones “One-pot”

Una síntesis de un solo recipiente se define como una estrategia para mejorar la eficiencia de una reacción química, mediante la cual un reactivo se somete a reacciones químicas sucesivas que ocurren en una secuencia particular en un solo reactor.(Hayashi, 2016) Este concepto, inicialmente desarrollado para síntesis orgánicas se ha ido ampliando con el tiempo para abarcar desde reacciones orgánicas multicomponente, organocatálisis, síntesis de polímeros y reacciones de catálisis enzimática.(Park, Naruse y Kato, 2012)(Wang *et al.*, 2015)

Las reacciones *one-pot* en las que se llevan a cabo secuencias de reacciones en el mismo recipiente de reacción constituyen uno de los métodos más versátiles a la hora de optimizar reacciones tanto económica como ambientalmente.(Hayashi, 2016) Cuando se llevan a cabo varias reacciones en un único reactor, sin aislar o purificar productos intermedios, podemos reducir las cantidades de disolvente, residuos, tiempo, mano de obra y costo, usualmente esto se conoce como “*pot-economy*”.(Hayashi, 2016)

5.1.2. Diseño de Experimentos

El diseño de experimentos es el diseño de cualquier actividad o proceso que tiene como objetivo describir o explicar la variación de la información en condiciones que hipotéticamente reflejan tal variación.(Creswell, 2009) En otras palabras, el diseño experimental es una técnica estadística que permite identificar y cuantificar las causas de un efecto dentro de un estudio experimental.(Ruiz-Leza *et al.*, 2007)

En un diseño experimental se manipulan deliberadamente una o más variables, vinculadas a las causas, para medir el efecto que tienen en una variable de interés.(Chun, 2012) El diseño experimental prescribe una serie de pautas relativas acerca de qué variables hay que manipular, de qué manera, cuántas veces hay que repetir el experimento y en qué orden para poder establecer con un grado de confianza predefinido la necesidad de una presunta relación de causa-efecto.(Devore, 2013) Correctamente aplicado, el diseñado de experimentos constituye una herramienta importantísima en el avance del conocimiento científico.

Un diseño de superficie de respuesta es un conjunto de técnicas avanzadas de diseño de experimentos (DoEs) que ayudan a entender mejor y optimizar la respuesta de un sistema.(Arnold, 2006) La metodología del diseño de superficie de respuesta suele utilizarse para refinar los modelos después de determinar los factores importantes utilizando otros tipos de diseños más básicos, especialmente si se sospecha que existe cierta curvatura o funcionalidad en la superficie de respuesta (Figura 90).(Lesik, 2010) Una superficie de respuesta completamente curvada (equiespacialmente), tal como la de la Figura 90 a, representa una funcionalidad polinómica frente a tres variables de interés. El caso opuesto, una superficie de respuesta completamente plana (Figura 90 b) corresponde a variables completamente independientes entre sí.

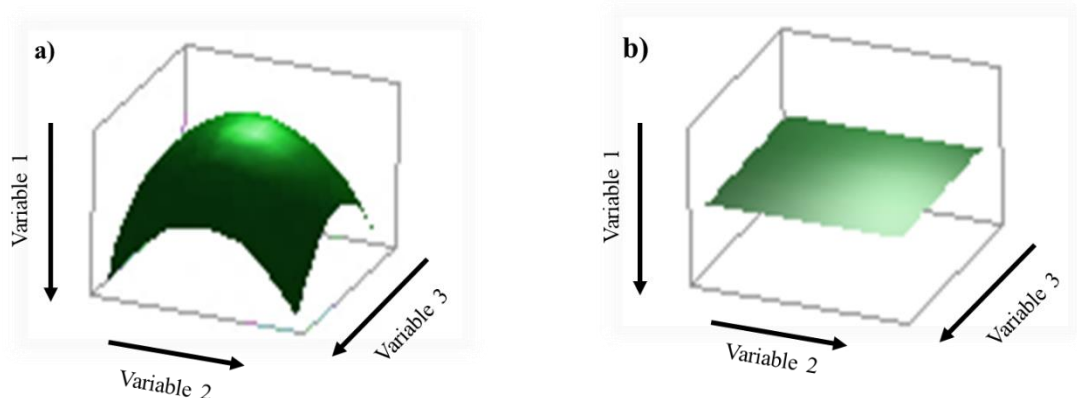


Figura 90: Posibles superficies de respuesta (a) con curvatura. (b) sin curvatura

Existen dos tipos principales de diseños de superficie de respuesta:

- Diseños centrales compuestos: los diseños centrales compuestos (*central composite desing*) pueden ajustarse a un modelo cuadrático completo. Suelen utilizarse cuando el plan de diseño requiere de un experimento secuencial, debido a que estos diseños pueden incluir información de un experimento factorial planeado correctamente.
- Diseños de *Box-Behnken*: los diseños de *Box-Behnken* por lo general tienen menos puntos de diseño que los centrales compuestos y, por consiguiente, resulta menos complejo ejecutarlos con el mismo número de factores. Pueden estimar eficientemente los coeficientes de primer y segundo orden; sin embargo, no pueden incluir corridas de un experimento factorial. Los diseños de *Box-Behnken* siempre tienen 3 niveles por factor alto, medio y bajo, a diferencia de los diseños centrales compuestos, que pueden tener hasta cinco. Nunca incluyen corridas donde todos los factores estén en su valor extremo. La ecuación de superficie de respuesta, generalmente de estructura polinómica, permite modelar la curvatura en la respuesta, lo que hace que sea útil para:
 - Estudiar la manera en que los cambios en las variables afectan una respuesta de interés.
 - Hallar los niveles de las variables que optimizan una respuesta.
 - Seleccionar las condiciones operativas para cumplir las especificaciones.

5.2. Materiales y Métodos

5.2.1. Materiales

Los reactivos químicos precursores de la reacción de polimerización son de calidad analítica (Sigma-Aldrich, Cicarelli). Como sustratos iniciadores de las reacciones de hidrólisis, sacarificación y fermentación se utilizaron almidón soluble (Cicarelli) y glucosa monohidratada (Cicarelli). Los biocatalizadores fueron proporcionados por Bio4 S.A., enzima ® *Novozyme 235, alpha-amylase*, ® *Novozyme 136 gluco-amylase* y *Saccharomyces cerevisiae*, ® *Ethanol Red*.

La síntesis de hidrogeles puros se describió detalladamente en la Sección 3.2.1.2.1. del Capítulo 3. A continuación, se describen la inmovilización simultánea de enzimas y levaduras

mediante IPA. Asimismo, siguiendo los lineamientos de los capítulos anteriores, hidrogeles puros, enzimas y levaduras libres se utilizaron como patrones de comparación respecto a hidrogeles con levaduras y/o enzimas inmovilizadas.

5.2.1.1. Levaduras y Enzimas Inmovilizadas en Hidrogeles Cilíndricos Monolíticos de Poliacrilamida

Levaduras *S. cerevisiae* y enzimas α -amilasa y β -amilasa fueron incorporadas simultáneamente a una misma matriz de inmovilización con el objetivo de analizar el efecto sinérgico entre estos bio-catalizadores y el soporte de inmovilización durante el ciclo completo de reacciones de licuefacción-sacarificación-fermentación, involucradas en la producción de bioetanol.

La preparación del catalizador tri-componente se realizó siguiendo los lineamientos pre-establecidos en la Sección 2.6.3.2., es decir, mediante polimerización radicalaria *in situ* con los componentes activos. El medio de síntesis fue ligeramente básico regulado mediante buffer de fosfato (Ver Anexo I). Como monómero se utilizó acrilamida (AAM, 1 M) y como agente entrecruzador químico N, N'-metilenbisacrilamida (BIS) relación molar 0,02:1 de BIS a monómero. Persulfato de amonio (APS, 5 mg mL⁻¹, Aldrich) y N, N, N', N'-tetrametilendiamina (TEMED, 10 μ L mL⁻¹, Aldrich) fueron utilizados como sistema iniciador.

Nuevamente, los compuestos químicos AAM, BIS y APS en buffer de fosfato constituyen la solución pre-gelificante (PGS). Se añaden a PGS 175 mg mL⁻¹ de levaduras *S. cerevisiae* previamente hidratadas, 125 mg L⁻¹ de enzima α -amilasa y 125 mg mL⁻¹ β -amilasa. Una vez homogeneizado el sistema PGS con cada uno de los catalizadores, se estabilizó a una temperatura cercana a 0 °C y se incorporó TEMED.

La polimerización radicalaria tuvo lugar a temperatura ambiente para obtener hidrogeles compactos, que minimicen la difusión de las enzimas hacia el exterior. Se obtuvieron esferas de hidrogeles ($d_p = 0,2$ cm, $e_p = 0,7$ mm espesor, hidratado). Los hidrogeles fueron posteriormente secados a 30 °C bajo vacío moderado, durante 48 h y lavados en agua destilada para remover vestigios de reactivos no consumidos durante 24 h y de nuevo secados en estufa en vacío a 30 °C.

5.2.1.2. Levaduras y Enzimas Inmovilizadas en Hidrogeles Esféricos Monolíticos de Poliacrilamida.

Las levaduras-enzimas inmovilizadas en hidrogeles esféricos se prepararon, bajo las mismas condiciones descriptas para IPA, pero en lugar de polimerizarse en moldes cilíndricos, se polimerizaron por goteo a velocidad controlada en una solución de alta viscosidad (Aceite 10w40, Hélix), utilizando un sistema de inyección y mezclado por goteo accionado mediante una bomba de infusión a jeringa (APEMA PC-11UBT).

La polimerización ocurre durante la sedimentación gravimétrica de la gota desde la superficie de la solución hasta el fondo del recipiente. Como la reacción suele ser muy rápida a temperatura ambiente (30 s), para retardar la polimerización, provocando que ésta efectivamente ocurra durante la sedimentación de la gota, el sistema de gelificación se enfría en baño de hielo durante 1 h. Con el objetivo de minimizar la amplia distribución de tamaños, se utilizó un sistema de inyección con mezclador automático (Figura 91) que combina la PGS conteniendo los componentes activos con el iniciador TEMED y gotea sobre aceite de alta viscosidad a una velocidad constante de 10 mL h⁻¹, lo que permitió la formación de esferas de hidrogel de tamaño homogéneo.

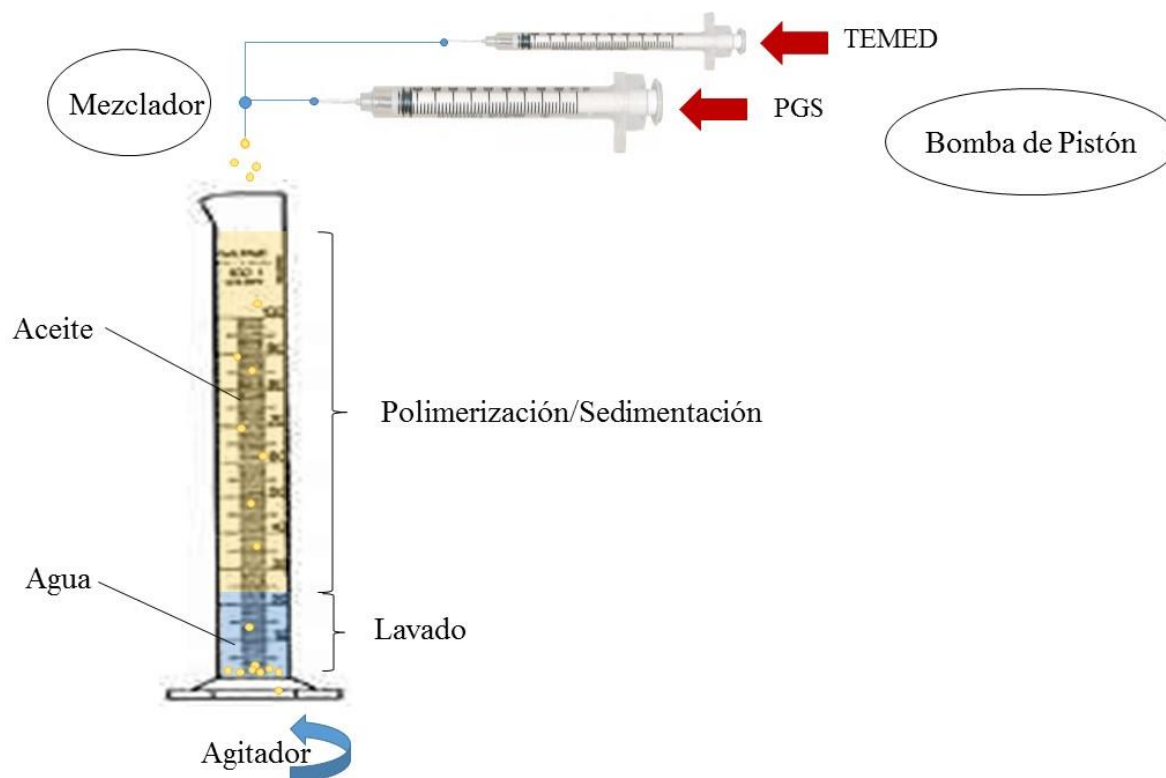


Figura 91: Sistema de preparación de hidrogeles esféricos por sedimentación.

Las fotografías de los hidrogeles preparados se muestran en la Figura 92. La Tabla 32 muestra los diferentes hidrogeles preparados.

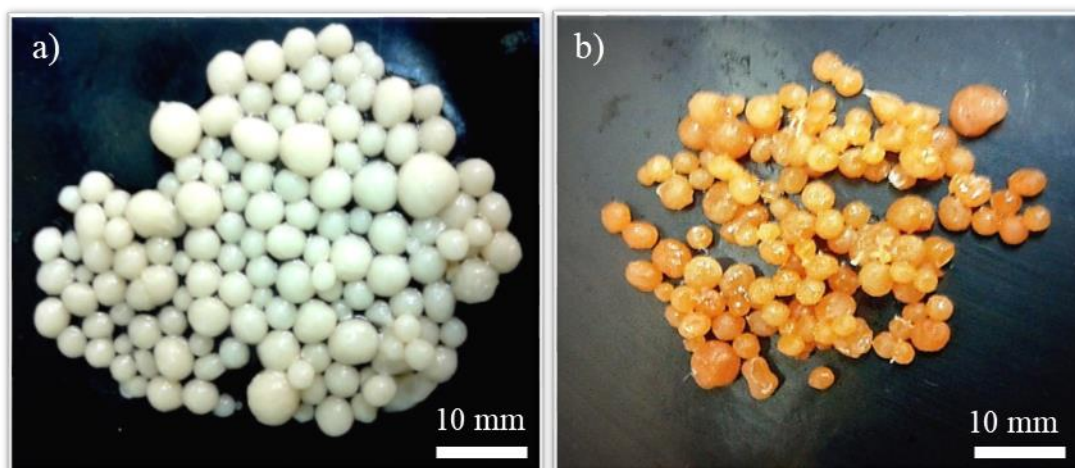


Figura 92: PAAm-Sc-GAa-2.a) Pastillas en estado hidratado b) Pastillas deshidratadas.

Tabla 32: Hidrogeles de poliacrilamida con levaduras y enzimas inmovilizadas.

Material	Morfología	Matriz	Componente Activo	Carga enzimática/celular, mg L ⁻¹ PGS
PAAm-Sc-GAa-1	Discos	AAm 1M	α -amilasa	125
			β -amilasa	125
			<i>S. cerevisiae</i>	175
PAAm-Sc-GAa-2	Esferas	AAm 1M	α -amilasa	125
			β -amilasa	125
			<i>S. cerevisiae</i>	175

5.2.2. Métodos de Análisis y Caracterización Hidrogeles Tri-componentes: Levaduras y Enzimas Inmovilizadas

Se realizaron ciclos batch de 96 h de reacción. Las reacciones se llevaron a cabo en ausencia de oxígeno, de acuerdo con las demandas requeridas por la reacción de fermentación. El volumen de reacción fue de 250 mL. Se utilizaron para cada reacción 100 catalizadores esféricos de 3 mm de diámetro. Como medio de cultivo fue empleada una solución de almidón

en concentración de 3 % p/p como fuente de energía y carbono, y Urea como fuente nitrogenada (Urea, 0,01 p/v, Sigma-Aldrich), como solvente se utilizó una solución buffer de citrato (pH 4-4,2), fosfato I (pH 5,5-5,8), fosfato II (pH 7,0-7,2) o tris (pH 7,2-7,5) de acuerdo al pH de operación.

La mezcla de reacción se agitó en un sistema isotérmico a temperatura controlada, el mismo utilizado en el análisis de la reacción de fermentación (Sección 4.2.2.6) Se tomaron muestras de 1 mL para cada caso analizado. Las muestras se extrajeron del medio de reacción y se centrifugaron a 15.000 rpm durante 10 min para eliminar levaduras y enzimas residuales, el sobrenadante fue extraído y almacenado a 5 °C, para detener la reacción. En estas condiciones la muestra fue analizada.

Para el análisis de los resultados y con el objetivo de maximizar la producción de etanol se aplicó un método de Diseño de Experimentos (Ruiz-Leza *et al.*, 2007) (Kleijnen, 2008) que permite optimizar procesos multivariados a partir de datos experimentales. Se utilizó software *Expert Design 10*, el cual permite un análisis estadístico de los parámetros de entrada (variables de entrada) y de salida (respuestas) del sistema.

A partir de la información obtenida es posible construir un análisis ANOVA para determinar el grado de influencia de las variables de entrada sobre la respuesta del sistema y la optimización multifactorial de una respuesta con el número mínimo de experiencias. (Martin, 1000) (Sthle y Wold, 1989)

Las variables a optimizar fueron: temperatura, pH, velocidad de agitación, tiempo de reacción y temperatura. El rango de valores de trabajo se muestra en la Tabla 33. Las respuestas del sistema fueron la concentración final de etanol, la productividad de etanol y la concentración final de glucosa. Las cuales fueron medidas experimentalmente por los métodos usuales, refractometría (etanol) y espectrofotometría (glucosa), desarrollados en la Sección 4.2.2.6 del Capítulo 4 y la Sección 3.4.6.1.1 del Capítulo 3, respectivamente.

Tabla 33: Variables de optimización, valores de trabajo. Reacciones de licuefacción, sacarificación y fermentación para levaduras y enzimas simultáneamente inmovilizadas.

Variable de entrada	Valor mínimo	Valor máximo
Temperatura, °C (A)	42 °C	50 °C
pH (B)	4,2	7,5
Agitación, rpm (C)	100 rpm	250 rpm
Tiempo, h (D)	48 h	96 h

Para los ensayos realizados, se utilizó el método estadístico de Superficie de respuesta (*response surface*) *Box-Behnken* que utiliza 29 corridas (Ferreira *et al.*, 2007) (De Leon, Kidd y Corzo, 2010).

5.3. Resultados y Discusiones

Se presentan los resultados obtenidos para el estudio simultáneo de las reacciones de obtención de bioetanol con PAAm-Sc-GAa-2. Los resultados se analizaron siguiendo un esquema de diseño de experimentos (DoEs) mediante el software *Design Expert 10*.

5.3.1. Diseño de Experimentos

Para optimizar el proceso se seleccionó el método estadístico de superficie de respuesta (*Surface response*) que utiliza 29 corridas con cuatro variables de entrada: temperatura de reacción (A), pH de reacción (B), velocidad de agitación (rpm) (C) y tiempo de operación (h) (D). Las corridas con sus respuestas, concentración de etanol (g L^{-1}) (R_1) y productividad volumétrica (g (L.s)^{-1}) (R_2) se muestran en la Tabla 34..

Tabla 34: Diseño experimental multivariado para el proceso de producción de etanol mediante hidrogeles con levaduras y enzimas inmovilizadas.

Corrida	Factores o Variables (Entrada)				Respuestas (Salida)		
	A T, °C	B pH	C Agitación, rpm	D Tiempo, h	R1 Etanol, gL ⁻¹	R2 Productividad, gL ⁻¹ h ⁻¹	R3 Glucosa gL ⁻¹
1	42	5,8	250	60	8,48	1,411	0,076
2	50	5,8	250	60	8,66	1,443	0,075
3	46	5,8	175	60	9,14	1,556	0,054
4	46	5,8	175	60	9,24	1,575	0,049
5	42	7,5	175	60	7,97	1,328	0,081
6	50	5,8	100	60	8,56	1,424	0,08
7	50	5,8	175	96	8,11	0,845	0,0032
8	42	5,8	175	24	4,05	1,687	0,2945
9	42	5,8	100	60	8,45	1,408	0,079
10	46	5,8	100	24	4,83	2,012	0,2876
11	46	5,8	250	96	9,58	0,998	0,0029
12	46	4,2	100	60	8,11	1,351	0,078
13	46	4,2	250	60	8,27	1,378	0,071
14	46	4,2	175	96	8,34	0,868	0,0041
15	46	5,8	250	24	4,91	2,045	0,2876
16	46	5,8	100	96	9,51	0,991	0,0035
17	42	5,8	175	96	8,65	0,886	0,0039
18	46	7,5	250	60	9,18	1,53	0,071
19	46	7,5	175	96	9,06	0,944	0,004
20	50	4,2	175	60	7,98	1,327	0,089
21	50	5,8	175	24	4,13	1,721	0,298
22	46	7,5	175	24	4,5	1,8	0,2932
23	50	7,5	175	60	8,09	1,348	0,078
24	46	4,2	175	24	4,66	1,94	0,295
25	46	7,5	100	60	9,09	1,515	0,077
26	46	5,8	175	60	9,25	1,542	0,076
27	46	5,8	175	60	9,23	1,538	0,078
28	42	4,2	175	60	8,15	1,358	0,067
29	46	5,8	175	60	9,22	1,537	0,077

5.3.2. Análisis Estadístico: Análisis de Varianza y Superficie de Respuesta

Para cada una de las respuestas experimentales y para el muestro total de las 29 corridas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) representado en las Tabla 35, Tabla 36 y Tabla 37. Además, se presentan los diagramas de superficie de respuesta en las Figura 93 a Figura 110 a partir de ecuaciones de predicción matemática.

Los gráficos de superficie de respuesta son diagramas 3D que vinculan dos variables (A: temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h) en función de una de las respuestas (R1= concentración de etanol, R2= Productividad Volumétrica de Etanol, R3= Respuesta 3: Concentración de Glucosa) manteniendo las restantes variables en valores constantes (se muestran a la izquierda del gráfico). Los colores indican cualitativamente las respuestas, las zonas rojas o “calientes” indican condiciones experimentales donde se logran valores máximos, zonas verdes indican las condiciones experimentales donde se logan valores medios y zonas azules o “frías” indican las condiciones experimentales donde se logran valores mínimos. Los resultados se muestran para cada respuesta.

5.3.2.1. Respuesta 1: Concentración de Etanol

En la Tabla 35 se presentan el ANOVA para concentración de etanol, Para todos los casos analizados, se considera variable significativa la que tenga un p-valor menor a 0,005.

Tabla 35: ANOVA para respuesta en concentración de etanol para producción de etanol mediante PAAm-Sc-GAa-2. GL = Grados de Libertad.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F-Valor	p-valor Prob > F	
<i>Modelo</i>	89,70	14	6,41	101,46	< 0,005	<i>Significante</i>
<i>A-Temperatura</i>	$4,033 \times 10^{-3}$	1	$4,033 \times 10^{-3}$	0,064	0,8042	<i>No significativa</i>
<i>B-Ph</i>	0,47	1	0,47	7,47	0,0161	<i>No Significante</i>
<i>C-Agitación</i>	0,023	1	0,023	0,37	0,5524	<i>No significativa</i>
<i>D-Tiempo</i>	57,07	1	57,07	903,75	< 0,0001	<i>No significativa</i>
<i>AB</i>	0,021	1	0,021	0,33	0,5731	<i>No significativa</i>
<i>AC</i>	$1,225 \times 10^{-3}$	1	$1,225 \times 10^{-3}$	0,019	0,8912	<i>No significativa</i>
<i>AD</i>	0,096	1	0,096	1,52	0,2377	<i>No significativa</i>
<i>BC</i>	$1,225 \times 10^{-3}$	1	$1,225 \times 10^{-3}$	0,019	0,8912	<i>No significativa</i>
<i>BD</i>	0,19	1	0,19	3,07	0,1018	<i>No significativa</i>
<i>CD</i>	$2,500 \times 10^{-3}$	1	$2,500 \times 10^{-3}$	$3,959 \times 10^{-3}$	0,9844	<i>No significativa</i>
<i>A^2</i>	3,68	1	3,68	58,24	< 0,0001	<i>Significante</i>
<i>B^2</i>	1,54	1	1,54	24,46	0,0002	<i>Significante</i>
<i>C^2</i>	0,011	1	0,011	0,17	0,6859	<i>No significativa</i>
<i>D^2</i>	29,20	1	29,20	462,40	< 0,0001	<i>Significante</i>
<i>Residuo</i>	0,88	14	0,063			<i>No significativa</i>
<i>Falta de ajuste</i>	0,88	10	0,088	4,41	0,011	<i>No significativa</i>
<i>Error puro</i>	$7,720 \times 10^{-3}$	4	$1,930 \times 10^{-3}$			
<i>Cor. Total</i>	90,58	28				

El ANOVA para respuesta de concentración de etanol (R1) establece como variables de significancia el tiempo de reacción, el pH de la reacción, el cuadrado de la temperatura, el cuadrado de pH y el cuadrado de tiempo; aunque la temperatura resultó no significativa parece también tener cierta influencia en la concentración de etanol. La falta de ajuste (*lack of fit*) no resultó significativa por lo que se concluye que el ajuste es adecuado, lo cual se corrobora con el valor de *R-Squared* cercano a 1 (0,9902), y valores de *Adj-Squared* (0,9805) y *Pred-Squared* (0,9441) adecuadamente similares entre sí. El modelo predice un ajuste cuadrático que se muestra en la Ecuación 6.

Ecuación 16: Modelo predictivo para respuesta de concentración de etanol para reacciones de producción de bioetanol con PAAm-Sc-GAm-2.

$$\begin{aligned} \text{Etanol} = & +9,220 - 0,018 A + 0,200 B + 0,044 C + 2,180 D + 0,072 A, B + 0,017 A, C \\ & - 0,160 A, D - 0,018 B, C + 0,220 B, D - 2,5 \times 10^{-3} C, D - 0,500 A^2 \\ & - 0,490 B^2 + 0,041 C^2 - 2,120 D^2 \end{aligned}$$

Donde cada sigla representa: A: temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h).

Las Figura 93 a Figura 98 muestran las superficies de respuestas para concentración de etanol para cada una de las combinaciones de variables posibles.

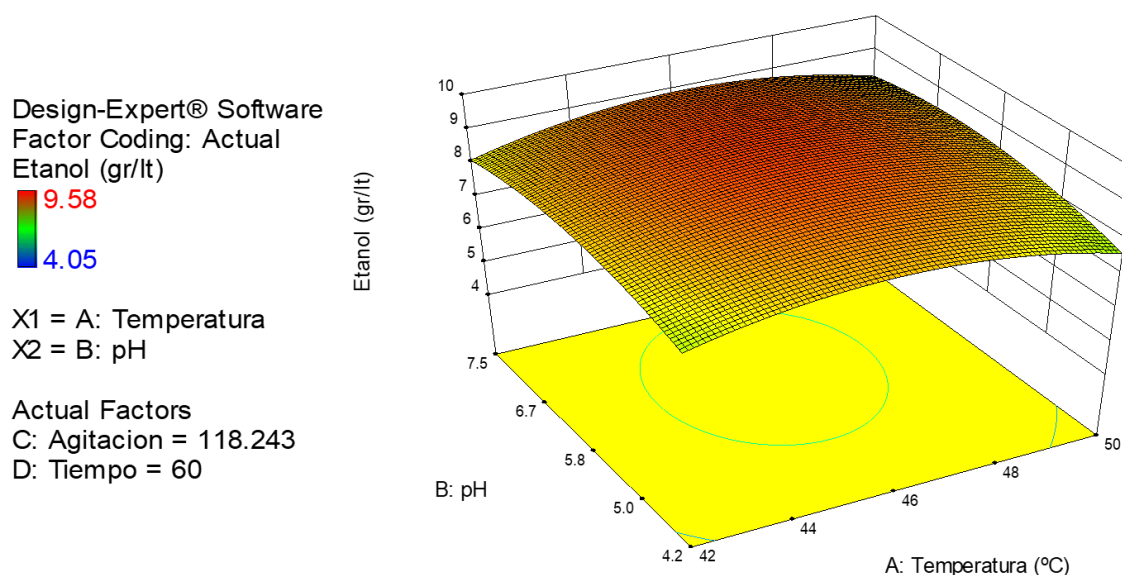


Figura 93: Superficie de respuesta para concentración de etanol en función de pH (B) y temperatura (A) para producción de etanol con PAAm-Sc-GAm-2. Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados a la izquierda del gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h).

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
Etanol (gr/lt)



X1 = A: Temperatura
X2 = C: Agitacion

Actual Factors
B: pH = 5.8
D: Tiempo = 60

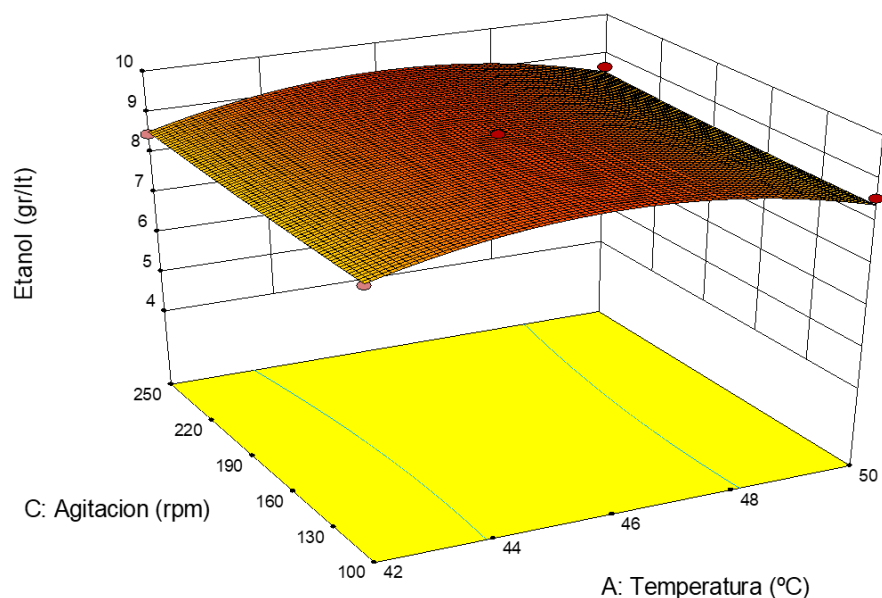


Figura 94: Superficie de respuesta para concentración de etanol con PAAm-Sc-GAm-2, en función de velocidad de agitación (C) y temperatura de reacción (A). Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados a la izquierda del gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h).

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
Etanol (gr/lt)



X1 = A: Temperatura
X2 = D: Tiempo

Actual Factors
B: pH = 5.8
C: Agitacion = 118.243

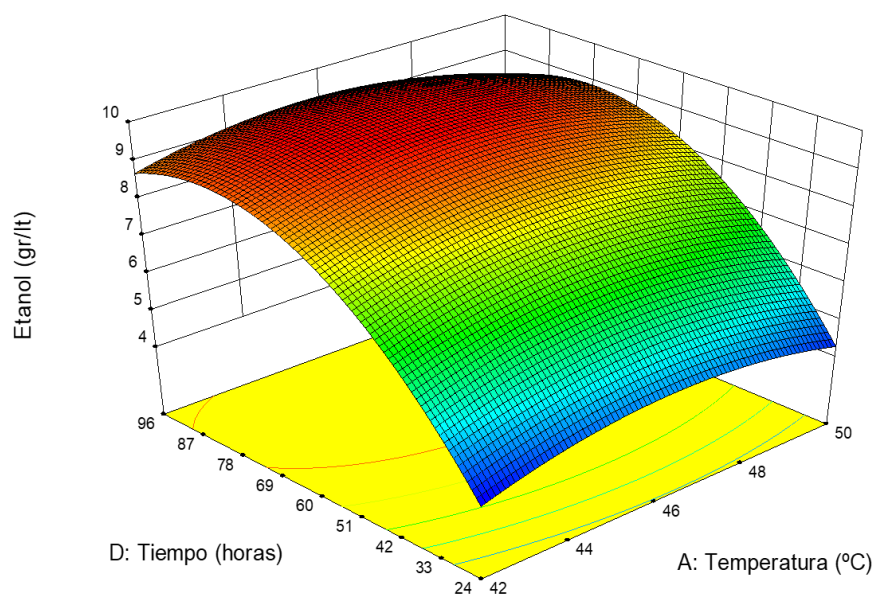
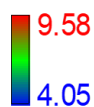


Figura 95: Superficie de respuesta para concentración de etanol en función de tiempo (D) y temperatura (A) con PAAm-Sc-GAm-2. Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados a la izquierda del gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h).

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
Etanol (gr/lit)



X1 = B: pH
X2 = C: Agitacion

Actual Factors
A: Temperatura = 46
D: Tiempo = 60

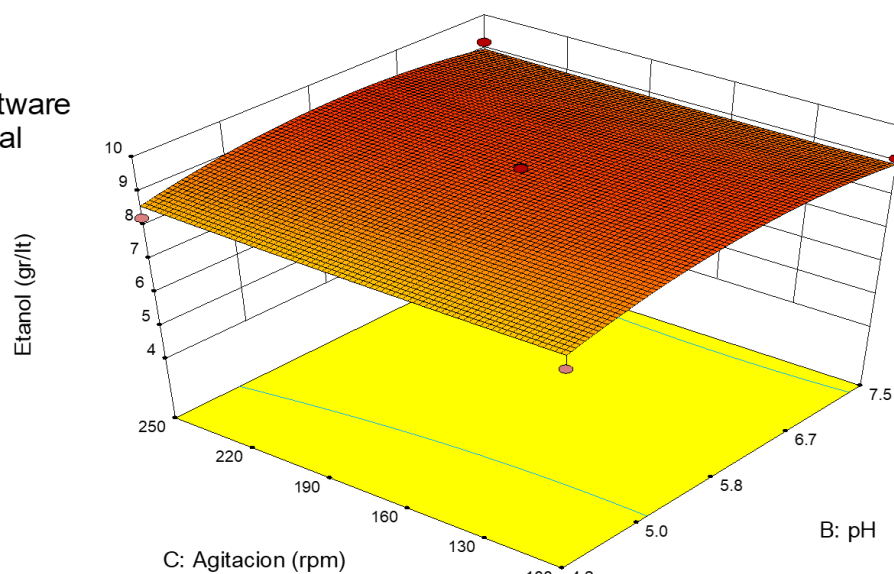
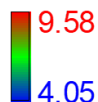


Figura 96: Superficie de respuesta para concentración de etanol en función de velocidad de agitacion (C) y pH (B) con PAAM-Sc-GAM-2. Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados a la izquierda del gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitacion (rpm), D: tiempo de reacción (h).

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
Etanol (gr/lit)



X1 = B: pH
X2 = D: Tiempo

Actual Factors
A: Temperatura = 46
C: Agitacion = 118.243

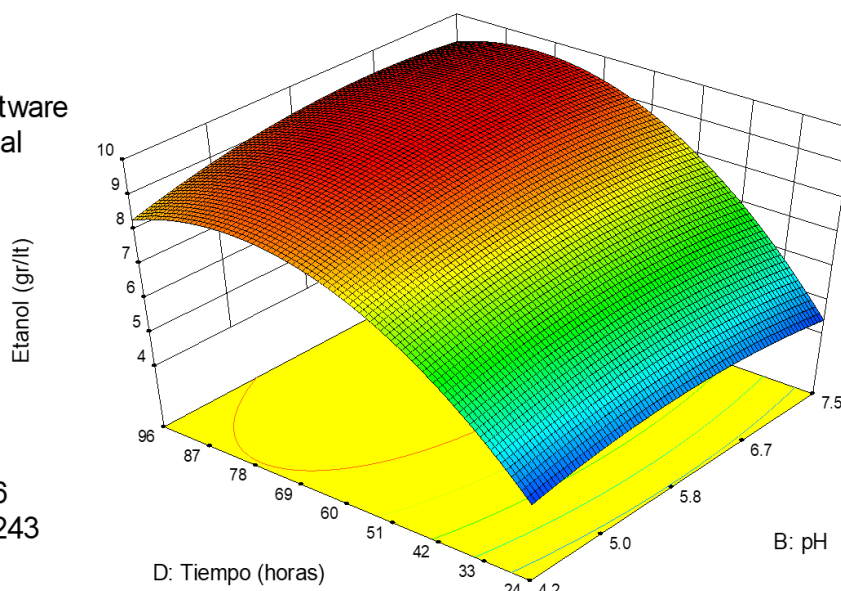
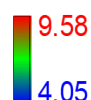


Figura 97: Superficie de respuesta para concentración de etanol con PAAM-Sc-GAM-2, en función del tiempo (D) y pH (B). Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados a la izquierda del gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitacion (rpm), D: tiempo de reacción (h).

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
Etanol (gr/lit)



X1 = C: Agitacion
X2 = D: Tiempo

Actual Factors

A: Temperatura = 46

B: pH = 5.8

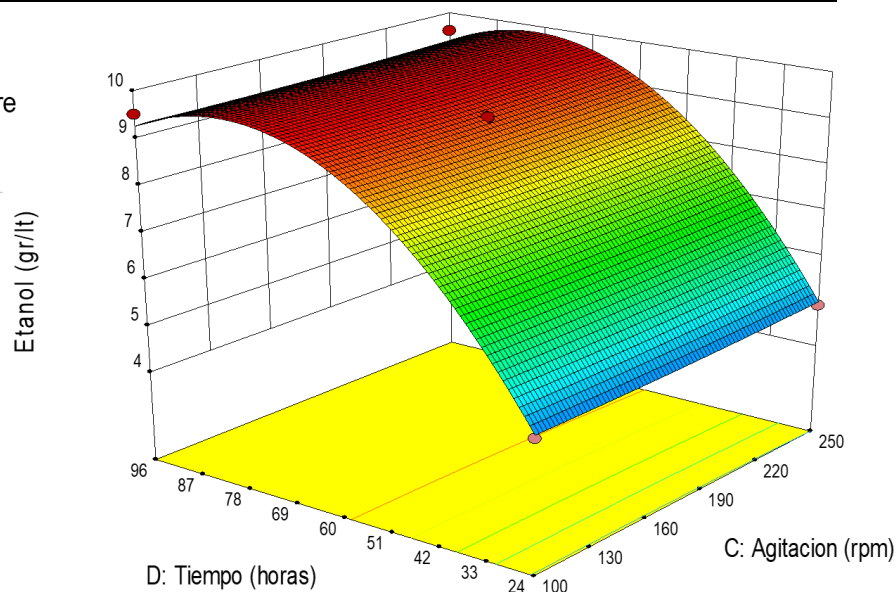


Figura 98: Superficie de respuesta para concentración de etanol con PAAm-Sc-GAm-2, en función de tiempo (D) y velocidad de agitación (C). Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados a la izquierda del gráfico, A: temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h).

Los gráficos de superficies de respuestas mostrados en las Figura 94 y

Figura 96 indican que, para el proceso global, la velocidad de agitación no parece modificar significativamente las concentraciones finales de etanol, que se mantienen en valores máximos para todo el rango de análisis.

La Figura 93 muestra que existe cierto decaimiento en la concentración de etanol cuando, tanto pH como temperatura se encuentran en sus valores extremos, tanto máximos como mínimos. Sin embargo, ofrecen una flexibilidad operativa que posibilita la obtención de altas concentraciones de etanol en un amplio rango de valores de trabajo. Por otro lado, las Figura 95, Figura 97 y Figura 98 muestran una notable importancia del tiempo de reacción sobre la concentración final de etanol, tiempos de reacción superiores a 50 h son requeridos en todos los casos para obtener estas respuestas máximas.

5.3.2.2. Respuesta 2: Productividad Volumétrica de Etanol

Debido a la importancia mostrada en los resultados respecto a la variable tiempo de reacción, se analiza la productividad de etanol, respuesta que relaciona la concentración de etanol lograda con el tiempo de operación requerido para alcanzar dicha concentración.

En la Tabla 36 se presenta el ANOVA para respuesta en productividad volumétrica de etanol. Se considera como variable significativa aquella que tenga un p-valor menor a 0,005. (Terrádez y Juan, 2010)

Tabla 36: ANOVA para respuesta de productividad volumétrica el proceso de producción de etanol mediante hidrogeles con levaduras y enzimas inmovilizadas (PAAm-Sc-GAm-2). GL= grados de libertad.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Valor medio	F-Valor	p-valor Prob > F	
<i>Modelo</i>	2,91	14	0,21	50,04	< 0,005	<i>Significante</i>
<i>A-Temperatura</i>	$7,500 \times 10^{-5}$	1	$7,500 \times 10^{-5}$	0,018	0,8950	<i>No significativa</i>
<i>B-pH</i>	$4,921 \times 10^{-3}$	1	4,921E-003	1,19	0,2946	<i>No significativa</i>
<i>C-Agitación</i>	$9,013 \times 10^{-4}$	1	$9,013 \times 10^{-4}$	0,22	0,6484	<i>No significativa</i>
<i>D-Tiempo</i>	2,68	1	2,68	646,11	< 0,0001	<i>No significativa</i>
<i>AB</i>	$6,503 \times 10^{-4}$	1	$6,503 \times 10^{-4}$	0,16	0,6982	<i>No significativa</i>
<i>AC</i>	$6,400 \times 10^{-5}$	1	$6,400 \times 10^{-5}$	0,015	0,9029	<i>No significativa</i>
<i>AD</i>	$1,406 \times 10^{-3}$	1	$1,406 \times 10^{-3}$	0,34	0,5698	<i>No significativa</i>
<i>BC</i>	$3,600 \times 10^{-5}$	1	$3,600 \times 10^{-5}$	$8,673 \times 10^{-3}$	0,9271	<i>No significativa</i>
<i>BD</i>	0,012	1	0,012	2,81	0,1159	<i>No significativa</i>
<i>CD</i>	$1,690 \times 10^{-4}$	1	1,690E-004	0,041	0,8430	<i>No significativa</i>
<i>A^2</i>	0,15	1	0,15	35,07	< 0,0001	<i>Significante</i>
<i>B^2</i>	0,049	1	0,049	11,88	0,0039	<i>Significante</i>
<i>C^2</i>	$1,499 \times 10^{-3}$	1	1,499E-003	0,36	0,5575	<i>No significativa</i>
<i>D^2</i>	0,042	1	0,042	10,23	0,0064	<i>Significante</i>
<i>Residuo</i>	0,058	14	$4,151 \times 10^{-3}$			
<i>Falta de ajuste</i>	0,057	10	$5,707 \times 10^{-3}$	22,01	0,046	<i>Significante</i>
<i>Error puro</i>	$1,037 \times 10^{-3}$	4	$2,593 \times 10^{-3}$			
<i>Cor. Total</i>	2,97	28				

El ANOVA para productividad volumétrica de etanol establece como variables de significancia el tiempo de reacción, el cuadrado de la temperatura, el cuadrado de pH y el cuadrado de tiempo. La falta de ajuste (*lack of fit*) resultó ligeramente significativa, sin embargo, los valores de ajuste *R-Squared* (0,9804), *Adj-Squared* (0,9608) y *Pred-Squared*

(0,8886) se encuentran dentro de los límites adecuados, aunque podrían mejorarse. El modelo predice un ajuste cuadrático que se muestra en la Ecuación 15.

Ecuación 15: Ecuación de predicción para respuesta de productividad volumétrica de etanol, para reacciones de producción de bioetanol con PAAm-Sc-GAm-2.

$$\begin{aligned} \text{Productividad } \left(\frac{g}{L \cdot h}\right) = & 1,550 + 2,5 \times 10^{-3} A + 0,020 B + 8,66 \times 10^{-3} C - 0,470 D + 0,013 A, B + \\ & 4,00 \times 10^{-3} A, C - 0,019 A, D - 3,00 \times 10^{-3} A, C - 0,019 A, D - 3,00 \times 10^{-3} B, C + 0,054 B, D - \\ & 6,5 \times 10^{-3} C, D - 0,150 A^2 - 0,087 B^2 + 0,015 C^2 - 0,081 D^2 \end{aligned}$$

dónde cada sigla representa: A: temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h).

Las Figura 99Figura 104 muestran las superficies de respuestas para productividad volumétrica de etanol para cada una de las combinaciones de variables posibles.

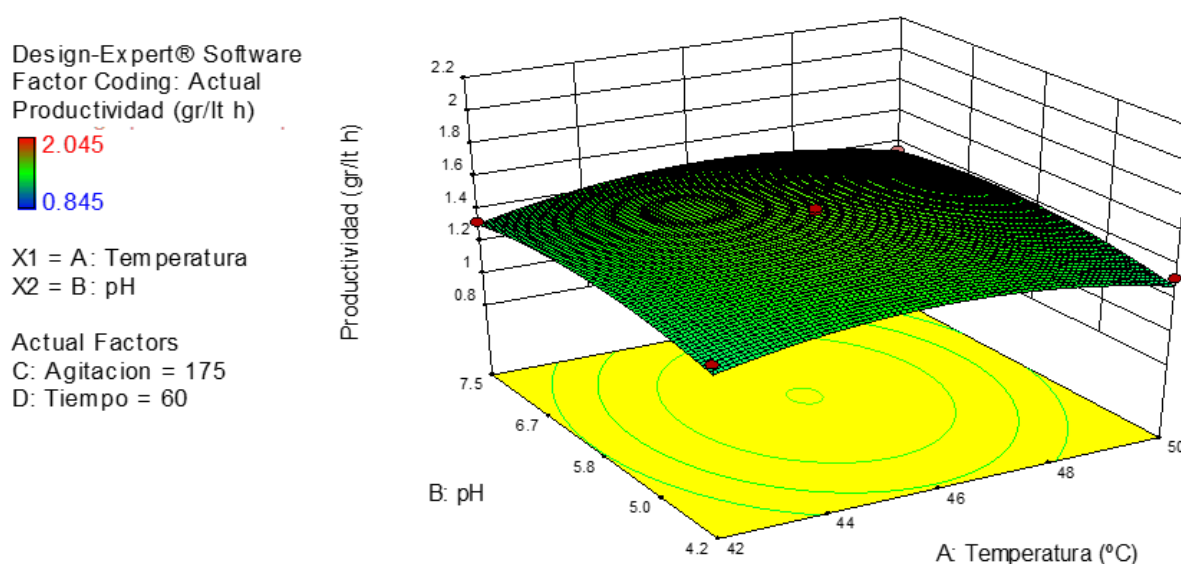


Figura 99: Superficie de respuesta para productividad volumétrica de etanol en función de pH (B) y temperatura (A) con PAAm-Sc-GAm-2, Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados a la izquierda del gráfico, A: temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h).

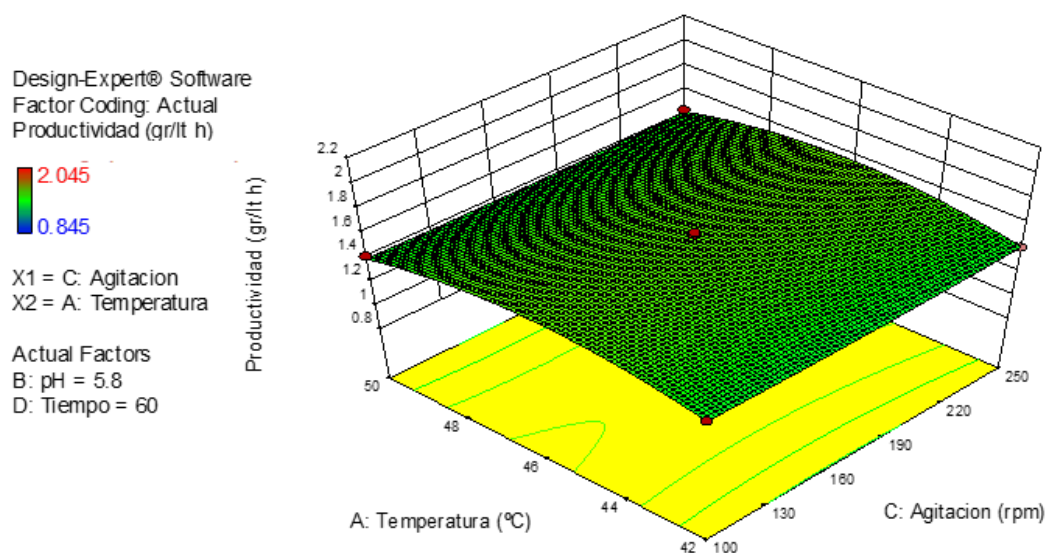


Figura 100: Superficie de respuesta para productividad volumétrica de etanol en función de temperatura (A) y agitación (C) con PAAM-Sc-GAm-2. Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados a la izquierda del gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h).

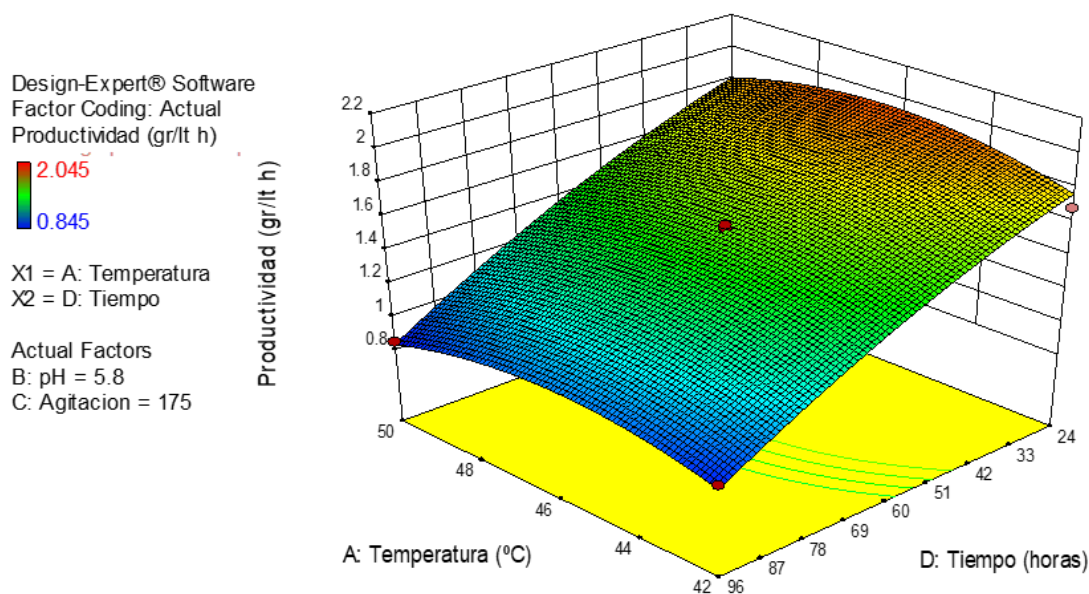


Figura 101: Superficie de respuesta para productividad volumétrica de etanol en función de temperatura y tiempo con PAAM-Sc-GAm-2. Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados a la izquierda del gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h).

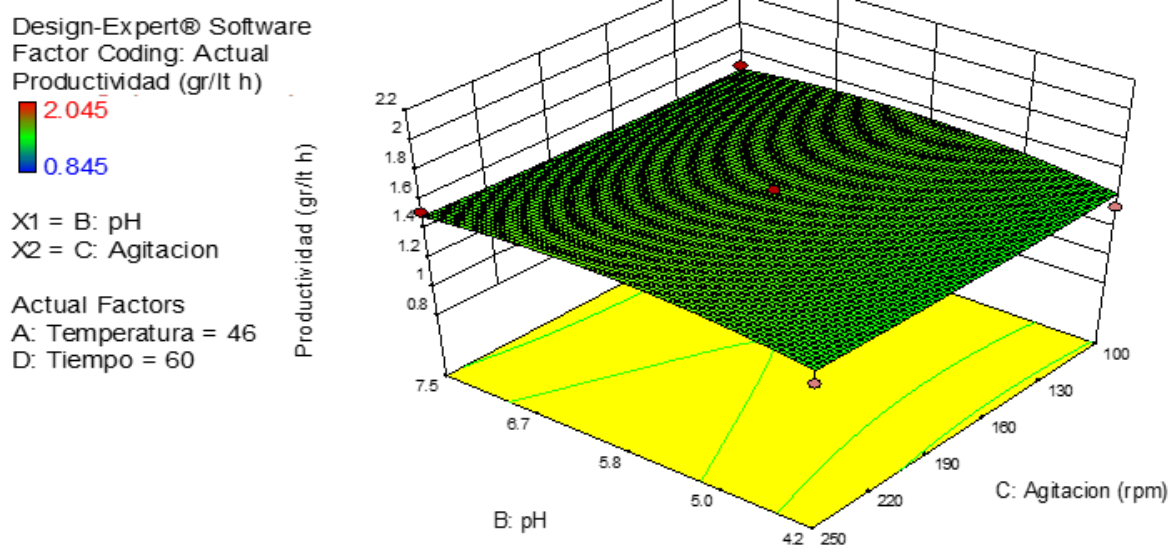


Figura 102: Superficie de respuesta para productividad volumétrica de etanol en función de pH y velocidad de agitación durante el proceso de producción de bioetanol con PAAm-Sc-GAm-2. Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados a la izquierda del gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h),

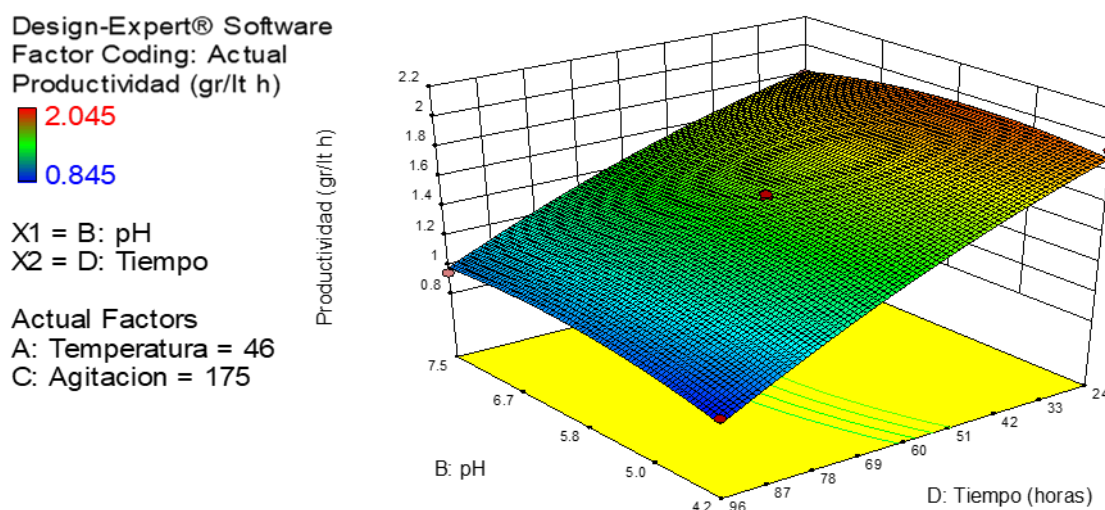


Figura 103: Superficie de respuesta para productividad volumétrica de etanol en función de pH y tiempo durante el proceso de producción de bioetanol con PAAm-Sc-GAm-2. Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados a la izquierda del gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h).

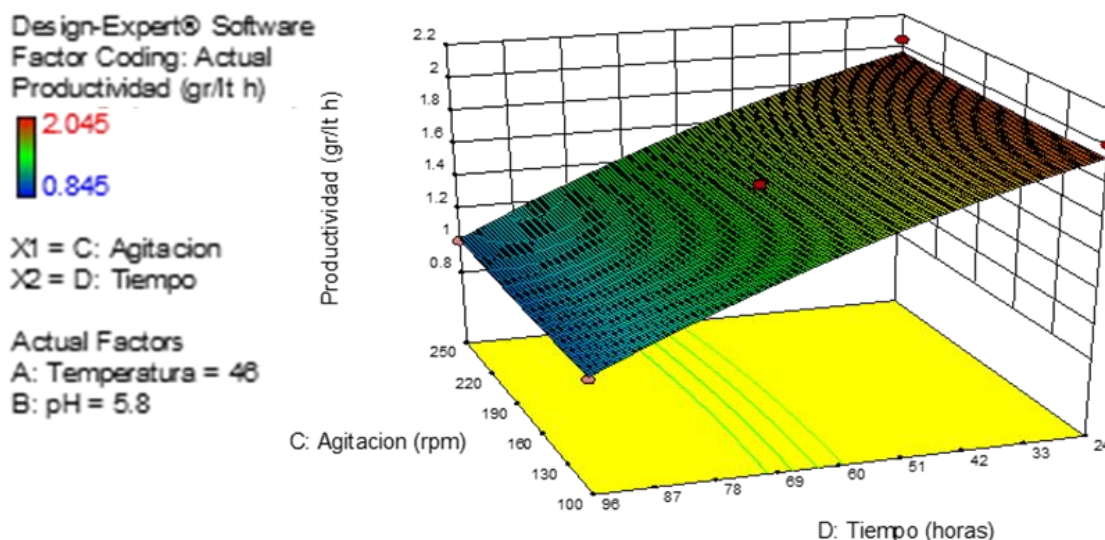


Figura 104: Superficie de respuesta para productividad volumétrica de etanol en función de velocidad de agitación y tiempo de reacción durante el proceso de producción de bioetanol con PAAM-Sc-GAM, Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados en el gráfico, A: temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h).

Nuevamente, se evidencia que, para el proceso global, la velocidad de agitación, el pH de reacción y la temperatura de operación no parecen modificar significativamente la productividad volumétrica de etanol, que se mantienen en valores máximos para todo el rango de análisis (Ver Figura 99, Figura 100, Figura 102). Este resultado resulta muy beneficioso a la hora de trasladar este proceso a una escala superior, dónde las condiciones de reacción no son tan fácilmente controlables como a escala laboratorio, ya que posibilita trabajar en una zona o región de máxima productividad, bajo condiciones de trabajo que pueden modificarse dentro de ciertos límites.

Por otro lado, las Figura 101, Figura 103 y Figura 104 muestran la marcada importancia del tiempo de reacción sobre la productividad final de etanol. Durante las primeras 40 h de operación la productividad aumenta casi linealmente, a partir de allí comienza un crecimiento más desacelerado. Luego de 60 h de operación, para todos los casos, la productividad de etanol aumenta muy lentamente. A partir de este resultado pueden indagarse conclusiones respecto al tiempo de operación óptimo.

5.3.2.3. Respuesta 3: Concentración de Glucosa

Por último, se analizó el consumo de glucosa considerando que para los tiempos de análisis monitoreados todo el almidón inicial se ha consumido y sólo queda glucosa en el medio de reacción. El consumo de glucosa resulta de interés para analizar si las cantidades iniciales de sustrato incorporadas al medio de reacción son las adecuadas o si existe deficiencia o exceso de sustrato.

En la Tabla 37 se presenta el ANOVA para respuesta en consumo (concentración) de glucosa. Se considera como variable significativa aquella que tenga un p-valor menor a 0,005.

Tabla 37: ANOVA para respuesta de consumo de glucosa durante el proceso de producción de etanol mediante hidrogeles con levaduras y enzimas inmovilizadas (PAAm-Sc-GAm-2). GL= Grados de Libertad.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F-Valor	p-valor Prob > F	
<i>Modelo</i>	0,29	14	0,021	317,38	< 0,005	<i>Significante</i>
<i>A-Temperatura</i>	$3,960 \times 10^{-5}$	1	$3,960 \times 10^{-5}$	0,61	0,4490	<i>No Significante</i>
<i>B-pH</i>	8,333E-010	1	8,333E-010	1,276E-005	0,9972	<i>No Significante</i>
<i>C-Agitación</i>	$3,888 \times 10^{-5}$	1	$3,888 \times 10^{-5}$	0,60	0,4531	<i>No Significante</i>
<i>D-Tiempo</i>	0,25	1	0,25	3839,05	< 0,0001	<i>Significante</i>
<i>AB</i>	$1,562 \times 10^{-4}$	1	$1,562 \times 10^{-4}$	2,39	0,1442	<i>No Significante</i>
<i>AC</i>	$1,000 \times 10^{-6}$	1	$1,000 \times 10^{-6}$	0,015	0,9033	<i>No Significante</i>
<i>AD</i>	$4,410 \times 10^{-6}$	1	$4,410 \times 10^{-6}$	0,068	0,7987	<i>No Significante</i>
<i>BC</i>	$2,500 \times 10^{-7}$	1	$2,500 \times 10^{-7}$	3,829E-003	0,9515	<i>No Significante</i>
<i>BD</i>	$7,225 \times 10^{-7}$	1	$7,225 \times 10^{-7}$	0,011	0,9177	<i>No Significante</i>
<i>CD</i>	$9,000 \times 10^{-8}$	1	$9,000 \times 10^{-8}$	$1,378 \times 10^{-3}$	0,9709	<i>No Significante</i>
<i>A^2</i>	$3,359 \times 10^{-4}$	1	$3,359 \times 10^{-4}$	1,14	0,3907	<i>No Significante</i>
<i>B^2</i>	$1,726 \times 10^{-4}$	1	$1,726 \times 10^{-4}$	2,64	0,1263	<i>No Significante</i>
<i>C^2</i>	$4,714 \times 10^{-5}$	1	$4,714 \times 10^{-5}$	0,72	0,4098	<i>No Significante</i>
<i>D^2</i>	0,038	1	0,038	578,51	< 0,0001	<i>Significante</i>
<i>Residuo</i>	$9,141 \times 10^{-4}$	14	$6,529 \times 10^{-5}$			
<i>Falta de ajuste</i>	$1,193 \times 10^{-4}$	10	$1,193 \times 10^{-5}$	0,060	0,9998	<i>No Significante</i>
<i>Error puro</i>	$7,948 \times 10^{-4}$	4	$1,987 \times 10^{-4}$			
<i>Cor. Total</i>	0,29	28				

El ANOVA para consumo de glucosa establece como variables de significancia el tiempo de reacción y el cuadrado de tiempo. La falta de ajuste (*lack of fit*) resultó no

significativa y los valores de ajuste *R-Squared* (0,9969), *Adj-Squared* (0,99937) y *Pred-Squared* (0,9934) se encuentran dentro de los límites adecuados. El modelo predice un ajuste cuadrático presentado en la Ecuación 16.

Ecuación 16: Modelo predictivo de superficie de respuesta de consumo de glucosa, para reacciones de producción de bioetanol con PAAm-Sc-GAm-2.

$$\begin{aligned} \text{Glucosa } \left(\frac{g}{l}\right) = & 0,067 + 1,817 \times 10^{-3} A + 8,333 \times 10^{-6} B - 1,800 \times 10^{-3} C - 0,140 D \\ & - 6,250 \times 10^{-3} A, B - 5,000 \times 10^{-4} A, C - 1,050 \times 10^{-3} A, D + 2,500 \times 10^{-4} B, C \\ & - 1,050 \times 10^{-4} B, C + 4,240 \times 10^{-4} B, D - 1,500 \times 10^{-4} C, D + 7,196 \times 10^{-3} A^2 \\ & + 5,158 \times 10^{-3} B^2 + 2,696 \times 10^{-3} C^2 + 0,076 D^2 \end{aligned}$$

dónde: A: temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h).

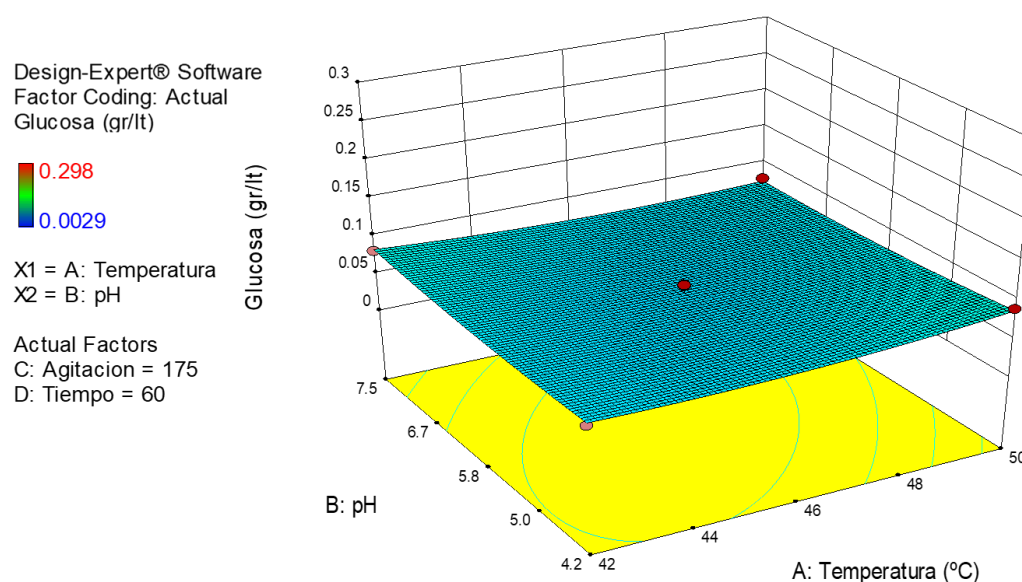


Figura 105: Superficie de respuesta para consumo (concentración) de glucosa en función de pH y temperatura durante el proceso de producción de bioetanol con PAAm-Sc-GAm-2. Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados en el gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h).

Design-Expert® Software

Factor Coding: Actual

Glucosa (gr/lt)

0.298

0.0029

X1 = A: Temperatura

X2 = C: Agitacion

Actual Factors

B: pH = 5.8

D: Tiempo = 60

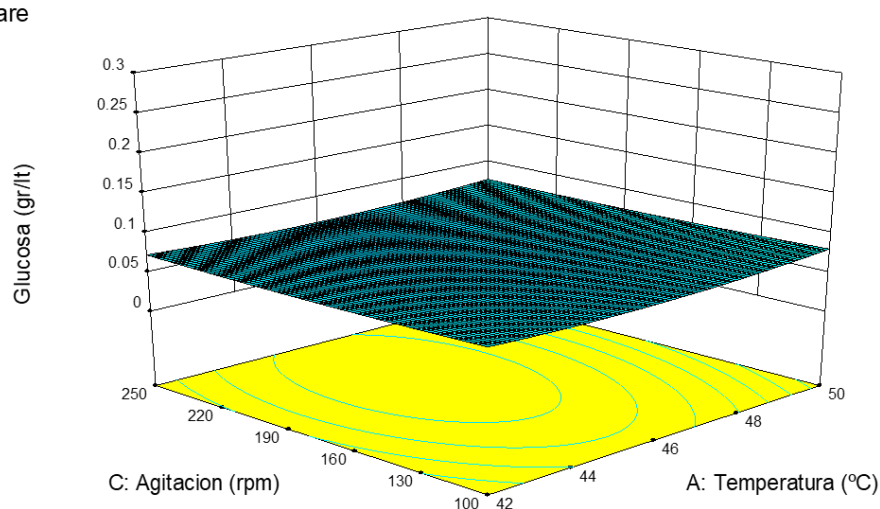


Figura 106: Superficie de respuesta para consumo (concentración) de glucosa en función de velocidad de agitación y temperatura durante el proceso de producción de bioetanol con PAAm-Sc-GAm-2. Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados en el gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h).

Design-Expert® Software

Factor Coding: Actual

Glucosa (gr/lt)

0.298

0.0029

X1 = A: Temperatura

X2 = D: Tiempo

Actual Factors

B: pH = 5.8

C: Agitacion = 175

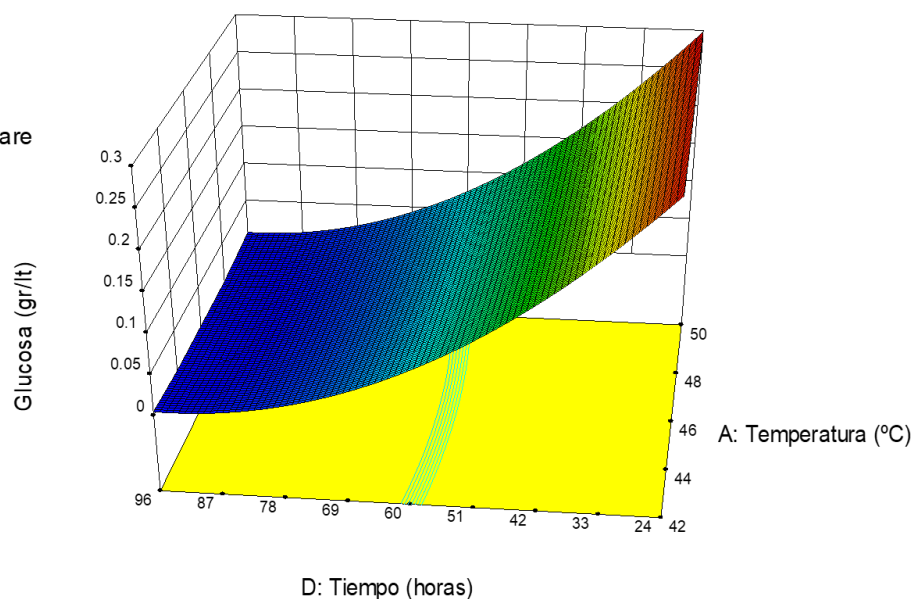
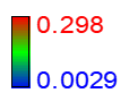


Figura 107: Superficie de respuesta para consumo (concentración) de glucosa en función de tiempo y temperatura durante el proceso de producción de bioetanol con PAAm-Sc-GAm-2. Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados en el gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h).

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
Glucosa (gr/lt)



X1 = B: pH
X2 = C: Agitacion

Actual Factors
A: Temperatura = 46
D: Tiempo = 60

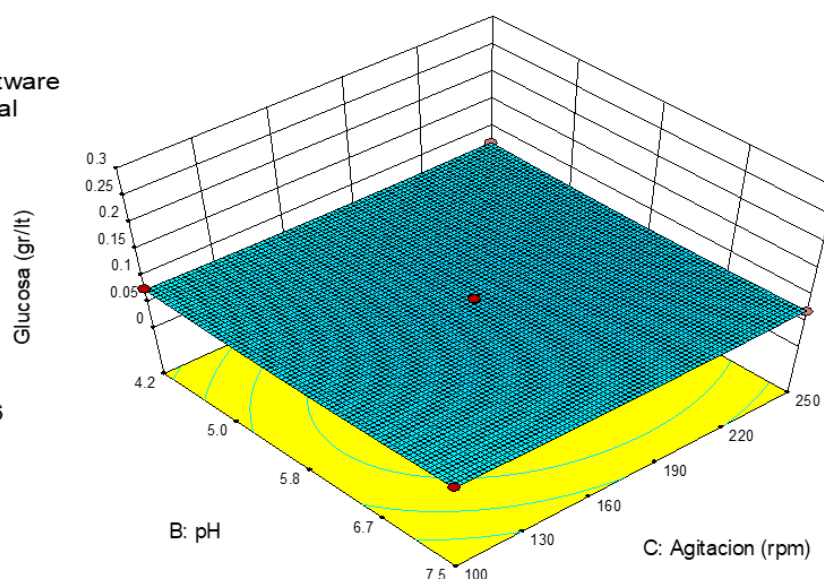


Figura 108: Superficie de respuesta para consumo (concentración) de glucosa en función de pH y velocidad de agitación durante el proceso de producción de bioetanol con PAAm-Sc-GAm-2. Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados en el gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h).

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
Glucosa (gr/lt)



X1 = B: pH
X2 = D: Tiempo

Actual Factors
A: Temperatura = 46
C: Agitacion = 175

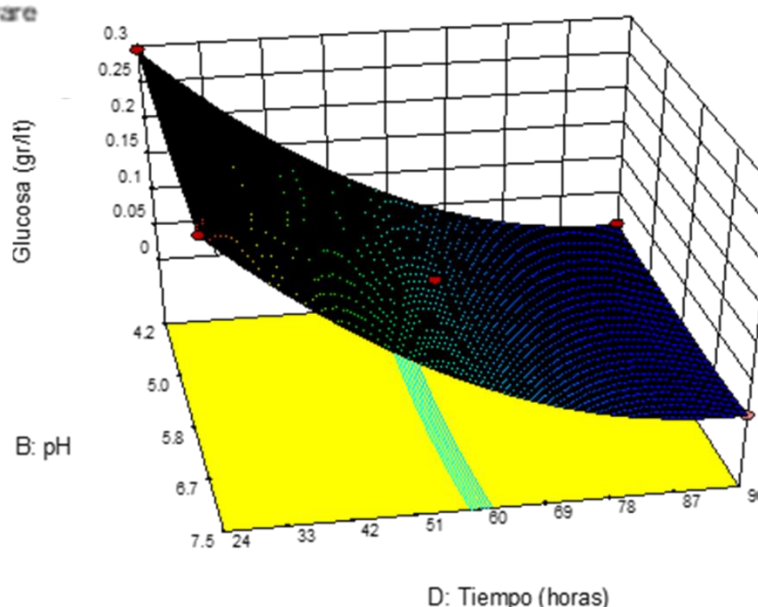


Figura 109: Superficie de respuesta para consumo (concentración) de glucosa en función de pH y tiempo de reacción durante el proceso de producción de bioetanol con PAAm-Sc-GAm-2. Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados en el gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h).

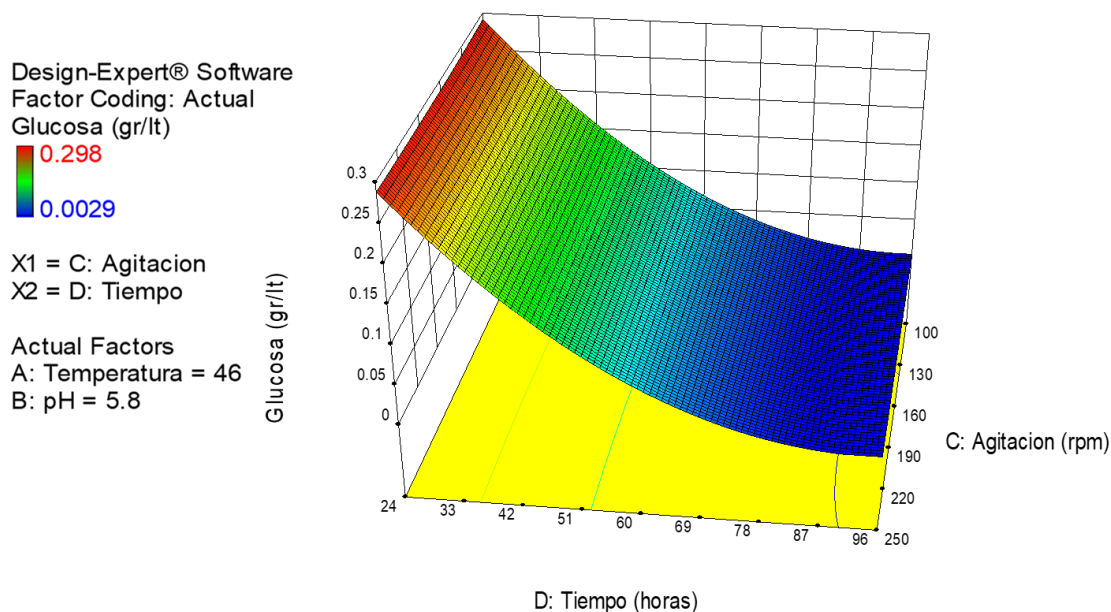


Figura 110: Superficie de respuesta para consumo (concentración) de glucosa en función de tiempo de reacción y velocidad de agitación durante el proceso de producción de bioetanol con PAAm-Sc-GAm-2. Las variables restantes se mantienen constantes en los valores expresados en el gráfico, A, temperatura de operación (°C), B: pH de la reacción, C: velocidad de agitación (rpm), D: tiempo de reacción (h).

El consumo de glucosa parece estar influenciado por el tiempo de reacción, presentando gran flexibilidad operativa respecto a la temperatura de operación, pH de reacción y velocidad de agitación, para el rango de análisis (Ver Figura 105, Figura 106 y Figura 108). Esto resulta muy beneficioso a la hora de trasladar este proceso a una escala superior, dónde las condiciones de reacción no son tan fácilmente controlables como a escala laboratorio.

Por otro lado, las Figura 107, Figura 109 y Figura 110 muestran la marcada importancia del tiempo de reacción sobre el consumo de glucosa. Para 20-24 h de reacción, la fermentación, posiblemente, aún no ha comenzado y la totalidad de la glucosa disponible se haya presente en el sistema.

Para 60 h de operación, es claro que, la reacción de fermentación ha comenzado, pero aún hay glucosa susceptible a ser consumida en el sistema. A este punto del proceso es donde se han determinado las productividades volumétricas máximas. Para 96 h de reacción casi la totalidad de la glucosa del sistema ha sido consumida por las levaduras; sin embargo, la productividad final de etanol a este tiempo de reacción ha disminuido; por lo tanto, podría decirse que no toda la glucosa consumida ha generado etanol, otras rutas metabólicas se han desarrollado simultáneamente.

5.3.3. Optimización del Sistema Inmovilizado Enzimas-Levaduras

Conforme a los resultados obtenidos, se propuso optimizar el sistema considerando los siguientes criterios, enumerados en orden de importancia:

- 1) Maximizar la productividad volumétrica de etanol
- 2) Mantener la concentración final de etanol superior a 7 g L^{-1}
- 3) Minimizar el tiempo de operación

Nuevamente, se utilizó el software *Design Expert 10*, que permite posterior análisis para realizar una optimización del proceso. La Tabla 38 resume los criterios utilizados.

Tabla 38: Criterios de optimización para producción de bioetanol utilizando PAAm-Sc-GAm-2.

Nombre	Objetivo	Límite inferior	Límite superior	Importancia (*)
A: Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	<i>Is in range</i>	42	50	+++
B: Ph	<i>Is in range</i>	4,2	7,5	+++
C: Agitación (rpm)	<i>Is in range</i>	100	250	+++
D: Tiempo (h)	<i>Minimize</i>	24	96	+++
Etanol (g L^{-1})	<i>Maximize</i>	7	9,58	+++
Productividad ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	<i>Maximize</i>	1	2,045	+++++
Glucosa (g L^{-1})	<i>Minimize</i>	0,0029	0,298	++

(*) Mayor importancia: + + + + +, Menor importancia: + +

El programa arroja hasta cien posibles soluciones generando la función “deseabilidad” (*desirability*), Esta función toma valores entre 0 y 1, donde 1 representa un criterio totalmente satisfecho y 0 uno totalmente insatisfecho. La Figura 111 muestra la mejor solución de optimización para el sistema, para la que se obtuvo una deseabilidad combinada (que maximiza todos los criterios de optimización) de 0,667 y una deseabilidad de 0,783 para concentración de etanol. La

Tabla 39 muestra los valores numéricos y la Figura 112 muestra la superficie de respuesta para las 25 mejores soluciones halladas.

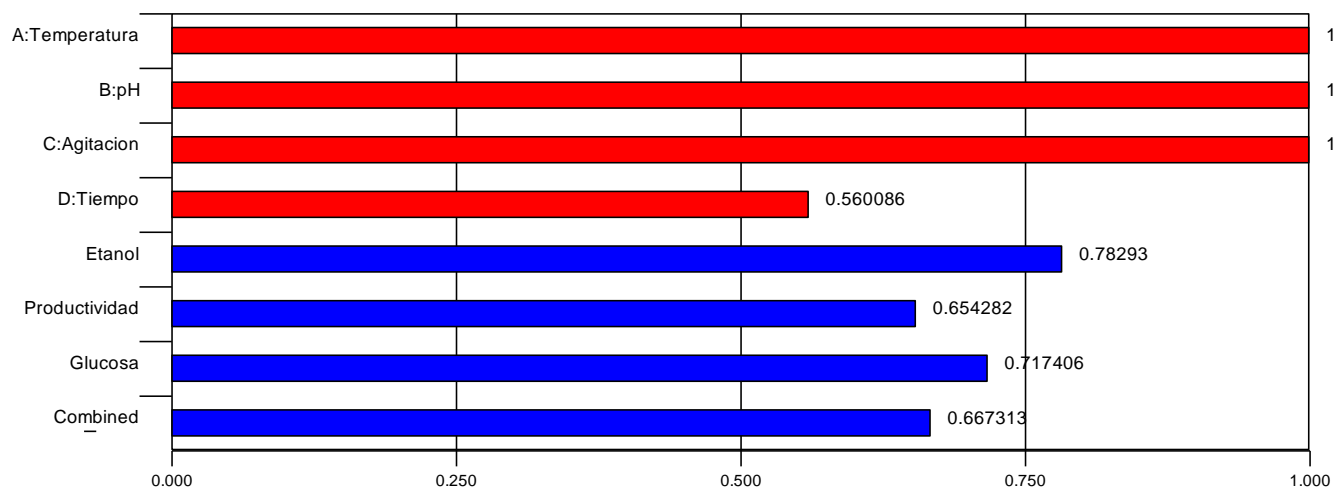


Figura 111: Diagrama de barras de optimización, objetivo maximizar productividad y concentración de etanol para producción de bioetanol mediante PAAm-Sc-GAm-2. Deseabilidad combinada 0,667313, Solución N°1.

Tabla 39: Soluciones de optimización, objetivo maximizar productividad y concentración de etanol para producción de bioetanol mediante PAAm-Sc-GAm-2.

Nº	T (°C)	pH	Agitación, rpm	Tiempo, h	Etanol, g L ⁻¹	Productividad, g L ⁻¹ h ⁻¹	Glucosa, g L ⁻¹	Deseabilidad
1	46,092	6,038	250,000	55,653	9,018	1,630	0,086	0,667 <i>Seleccionado</i>
2	46,079	6,021	249,997	55,497	9,006	1,632	0,087	0,667
3	46,126	6,054	249,999	55,569	9,012	1,631	0,087	0,667
4	46,138	6,018	249,998	55,688	9,020	1,630	0,086	0,667
5	46,077	6,003	250,000	55,656	9,017	1,631	0,086	0,667
6	46,036	6,050	250,000	55,842	9,033	1,628	0,086	0,667
7	46,170	6,071	249,998	55,642	9,018	1,630	0,086	0,667
8	46,105	6,070	249,996	55,267	8,990	1,635	0,088	0,667
9	46,079	6,003	250,000	56,182	9,057	1,624	0,084	0,667
10	46,087	5,956	249,996	55,743	9,022	1,629	0,086	0,667
11	45,939	5,989	249,998	55,379	8,995	1,634	0,088	0,667
12	46,274	6,003	249,995	55,455	9,000	1,633	0,087	0,667
13	45,924	6,101	249,997	56,346	9,070	1,621	0,083	0,667
14	46,201	6,158	249,994	55,297	8,991	1,634	0,088	0,667
15	46,083	5,976	249,997	56,720	9,094	1,617	0,082	0,667
16	45,758	6,165	249,998	56,117	9,049	1,622	0,084	0,666
17	46,353	6,112	249,998	53,775	8,869	1,653	0,095	0,665
18	45,633	5,748	249,999	55,222	8,955	1,633	0,088	0,664
19	45,993	6,100	100,001	56,108	8,970	1,606	0,088	0,653
20	45,983	6,123	100,004	56,045	8,965	1,607	0,088	0,653
21	45,952	6,111	100,009	56,012	8,963	1,607	0,088	0,653
22	45,987	6,135	100,003	56,226	8,979	1,605	0,087	0,653
23	46,095	6,064	100,001	55,884	8,951	1,609	0,089	0,653
24	45,944	6,022	100,012	55,729	8,938	1,611	0,090	0,653
25	45,968	5,967	100,001	55,808	8,941	1,610	0,089	0,653

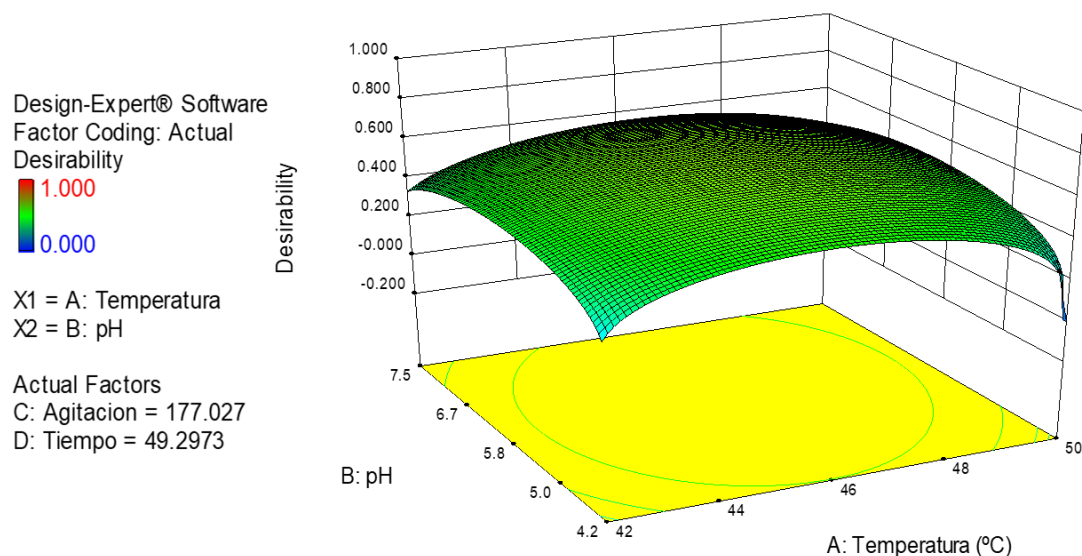


Figura 112: Superficie de respuesta para soluciones de optimización, objetivo maximizar productividad y concentración de etanol para producción de bioetanol mediante PAAm-Sc-GAm-2.

Este análisis establece que las variables de trabajo que arrojan los resultados óptimos para el sistema en consideración son: 46,1°C, pH 6,0, 250 rpm y 55,66 h de operación. La deseabilidad presenta valores máximos en un amplio intervalo operativo, lo que resulta beneficioso a la hora de tolerar fluctuaciones en las variables operativas, no siempre fácilmente controlables a gran escala.

5.4. Conclusiones Parciales

En esta última instancia de la tesis doctoral, fue demostrado que un único catalizador conteniendo cantidades óptimas de levaduras y enzimas inmovilizadas es capaz de realizar la conversión de almidón a etanol atravesando las tres etapas de reacción: licuefacción, sacarificación y fermentación en un mismo bio-reactor y con una amplia versatilidad operativa. Las condiciones de operación más convenientes en cuanto a mayores respuestas en concentración y productividad volumétrica finales de etanol fueron determinadas estadísticamente mediante un Diseño de Experimentos, utilizando un modelo de Superficie de Respuestas. Este resultado podría sentar un precedente a la hora de implementar un proceso de producción de etanol *one-pot* a elevada temperatura (50 °C), lo que reduciría costos operativos y energéticos a nivel industrial. Por otro lado, esta flexibilidad operativa permitiría soportar fluctuaciones en las variables sin alterar

significativamente los valores de producción finales. Finalmente, los resultados obtenidos podrían utilizarse para realizar un *scaling-up* a *bench scale* (reactor de 3 L) para corroborar su reproducibilidad.

6. Análisis de Sustentabilidad Ambiental o *Greenness*

6.1. Introducción

La optimización de un proceso implica una performance eficiente y económicamente rentable; seguridad operativa y bajo impacto ambiental. Para evaluar la calidad de una nueva tecnología, reacción o proceso es importante examinar todos sus componentes. Para esto, se han desarrollado métricas parciales para la determinación de la eficiencia ecológica. Estas métricas, se utilizan principalmente como una herramienta de predicción para los procesos químicos en una escala mayor o para la sustitución de un proceso químico tradicional por uno alternativo. (Tobiszewski *et al.*, 2010) Si bien la determinación de la huella de carbono (*ecological footprint*) constituiría la forma más completa de análisis ecológico, la sustentabilidad de las reacciones catalíticas puede analizarse de una forma simple y rápida mediante dos criterios ampliamente difundidos en materia de *Green Chemistry: Eco-Scale* y *Green-Star*. (Ribeiro *et al.*, 2010)

La *Eco-Scale* utiliza seis principios básicos como pilares de evaluación del carácter verde o *greenness* de reacciones a escala laboratorio, estos son: precio de los componentes, seguridad, aspectos técnicos, temperatura/tiempo (eficiencia energética) y tratamiento final (*work-up*) y purificación. Un máximo de 100 puntos correspondería a un sistema ideal de reacción completamente sustentable. Esta escala contiene puntos de penalización (Ver Anexo III), de acuerdo a ciertos criterios pre-establecidos, que restan puntos sobre el máximo de la escala. (Van Aken *et al.*, 2006) Una reacción o esquema de reacciones podría ser considerada como “verde” si obtiene una puntuación final de al menos 60 puntos en la *Eco-Scale*. (Lin *et al.*, 2009)

La *Green Star Metric* (GS) presenta un método semi-cuantitativo para la evaluación global de la sustentabilidad de reacciones químicas llevadas a cabo en el laboratorio. (Ribeiro *et al.*, 2010) El objetivo es ayudar a la elección de la reacción más aceptable implementando los “12 principios de la química verde”. (Anastas y Warner, 1998) La métrica consiste en la evaluación de tales principios mediante criterios pre-definidos seguido de una representación gráfica de los resultados mediante un diagrama radial, que conforma una estrella de 12 picos (un pico por cada principio) cuanto más completo esté el gráfico (mayor área cubierta verde), mayor grado de sustentabilidad poseerá el método de reacción. (Ribeiro *et al.*, 2010) La Figura 113 muestra distintos ejemplos de estrellas verdes. El diagrama 113-a representa el proceso original, el diagrama 113-b representa un proceso

alternativo ecológicamente más sustentable y el diagrama 113-c una alternativa menos sustentable.

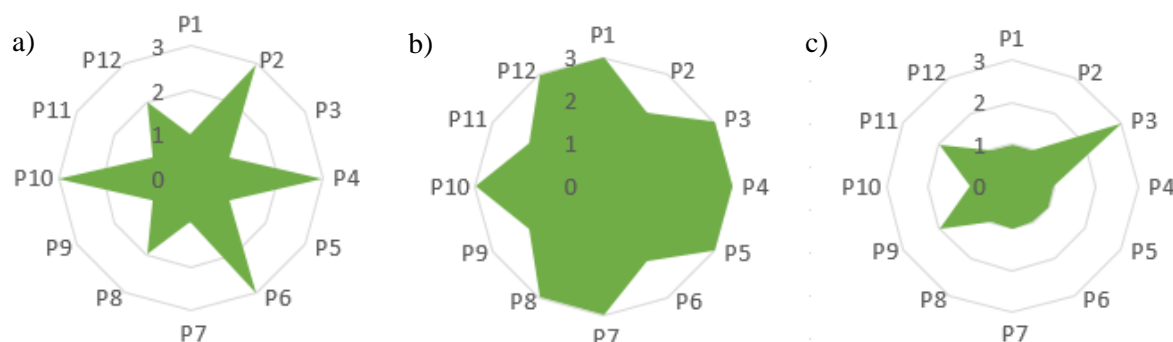


Figura 113: Diagramas de *Green Star*. a) Proceso original b) Proceso alternativo más sustentable (Mayor área cubierta. c) Proceso alternativo menos sustentable (Menor área cubierta).

6.2. Análisis de Sustentabilidad *Eco-Scale* y *Green Star* para α -Amilasa Libre e Inmovilizada.

La Tabla 40 muestra, a modo comparativo, las *Eco-Scales* obtenidas para las reacciones de licuefacción para enzimas α -amilasa inmovilizadas (en matrices de hidrogel y de alginato) y libres. Como ya se mencionó, una reacción o proceso químico puede considerarse como sustentable si obtiene al menos 60 puntos en la *Eco-Scale*. Los valores calculados fueron comparados con la reacción original con enzimas libres, la cual obtuvo una puntuación de 91 puntos para un ciclo de reacción (dato no presentados) y de 45 puntos para 5 ciclos de reacción. La potencial reusabilidad de los catalizadores que ofrecen los hidrogeles monolíticos, expresada en el rendimiento, hace la diferencia en la puntuación final, de esta forma, la reacción inicialmente no sustentable (15 puntos) se convierte a sustentable (77 puntos) gracias a la posibilidad de reutilización. Lo contrario ocurre con enzimas inmovilizadas en alginato, lo que confirma que este sistema de inmovilización no resulta adecuado para la aplicación requerida.

Como un único criterio de evaluación resultaría insuficiente para definir a una reacción como sustentable o no, continuamos el análisis con la realización de esquemas *Green Star*. La métrica consiste en la evaluación de tales principios mediante criterios predefinidos seguido de una representación gráfica de los resultados en un diagrama radial de Excel, cuanta más área contenga el gráfico, mayor grado de sustentabilidad poseerá el método de reacción. Siguiendo los mismos lineamientos que en la determinación de la *Eco-Scale*, se presentan en la

Tabla 41 los parámetros evaluados y el puntaje obtenido para cada caso bajo análisis (3-puntaje máximo, 1-puntaje mínimo).

Tabla 40: Eco-Scale para reacción de licuefacción empleando levaduras libres e inmovilizadas.

Reacción de licuefacción	PAAm-Amy-6	Puntos de penalización (1 ciclo)	Puntos de penalización (5 ciclos)
<i>Rendimiento</i>	32 % para 1 ciclo de reacción 87 % para 5 ciclos de reacción	66	4
<i>Precio de los componentes de la reacción/ kg</i>	Matriz polimérica: acrilamida: Costoso (> € 50)	5	5
	Enzima α -amilasa Costoso (> € 50)	5	5
	Almidón + Caldo de cultivo Poco costoso (\approx € 10)	3	3
	Subtotal precio de los componentes	13	13
<i>Seguridad</i>	Matriz polimérica poli-acrilamida: Tóxica	5	5
	Enzima α -amilasa: No peligroso	0	0
	Solvente: No peligroso \rightarrow Agua	0	0
	Subtotal Seguridad	5	5
<i>Aspectos operativos</i>	Común o Reflujo	0	0
<i>Temperatura/Tiempo</i>	Calentamiento < 24 h	1	1
	Subtotal Temperatura/Tiempo	1	1
<i>Work-up /Purificación</i>	Filtración Simple	0	0
<i>Puntos de penalización totales</i>		85	23
<i>Resultado Eco Scale</i>		15	77

Reacción de licuefacción	Alg-Amy-2	Puntos de Penalización (1 ciclo)	Puntos de Penalización (5 ciclos)
<i>Rendimiento</i>	96 % para 1 ciclo de reacción 21 % para 5 ciclos de reacción	2	39
<i>Precio de los componentes de la reacción/ kg</i>	Matriz polimérica: Alginato de sodio, Poco barato (\approx € 10)	3	0
	Enzima α -amilasa: Costoso (> € 50)	5	5
	Almidón + Caldo de cultivo: Poco Costoso (\approx € 10)	3	3
	Subtotal Precio de Componentes	8	8
<i>Seguridad</i>	Matriz polimérica Alginato de sodio, No peligroso	0	0
	Enzima α -amilasa: No Peligroso	0	0
	Solvente No Peligroso \rightarrow Agua	0	0
	Subtotal Seguridad	0	0
<i>Aspectos operativos</i>	Común o Reflujo	0	0
<i>Temperatura/Tiempo</i>	Calentamiento < 24 h	1	1
	Subtotal Temperatura / Tiempo	1	1
<i>Work-up /Purificación</i>	Filtración Simple	0	0
<i>Reacción de licuefacción</i>		14	48
<i>Rendimiento</i>		85	52

Tabla 41: Green Star tabla de evaluación para reacción de licuefacción vía α -amilasa para enzimas libre (Free-Amy), PAAm-Amy-6 y Alg-Amy-2. 3-Puntaje máximo, 1-Puntaje mínimo.

Principios		Free-Amy		PAAm-Amy-6		Alg-Amy-2	
P1	Prevención	2	Residuos degradables	2	Residuos recuperables	2	Residuos degradables
P2	Economía Atómica	3	Alta conversión	2	Baja conversión	3	Alta conversión
P3	Síntesis química poco peligrosa	3	Sin peligros	1	Síntesis hidrogel	2	Preparación perlas de Alg.
P4	Compuestos químicos seguros	3	Agua.	2	Síntesis hidrogel	3	Preparación perlas de Alg.
P5	Solventes y auxiliares seguros	3	Solv. = agua	3	Solv. = agua	3	Solv. = agua
P6	Eficiencia Energética	2	Cond. Suaves	3	Reutilización	2	Cond. Suaves
P8	Reducción de subproductos derivados	3	No subproductos	3	No subproductos	3	No subproductos
P9	Catálisis	1	Cat. No recuperable	3	Cat. Recuperable	1	Cat Recup. Parcial
P10	Degradación	3	Degradables	2	No citotóxicos	3	Degradables
P12	Química segura	3	Agua	2	Comp. Org.	3	Agua

En la Figura 114 los gráficos de *Green Star* para las reacciones. Estos parámetros, en algunos casos coinciden con los de *Eco-Scale*, pero también excluyen e incluyen nuevas variables de análisis. Para las reacciones consideradas el principio P11 (*Real-time analysis for pollution prevention*, Análisis de prevención de contaminación en tiempo real) fue excluido por no concernir al análisis.

Como se puede observar en las Figura 114 a-c nuevamente el proceso original resulta levemente más sustentable (mayor área cubierta), aunque las diferencias en este caso no son tan marcadas. Los principios P6 y P9 relacionados a la eficiencia energética, la reutilización y la catálisis favorecen el procedimiento vía PAAm-Amy-6, mientras que los principios que están indirectamente relacionados con la síntesis del hidrogel, P3, P4 y P10 disminuyen la sustentabilidad del proceso.

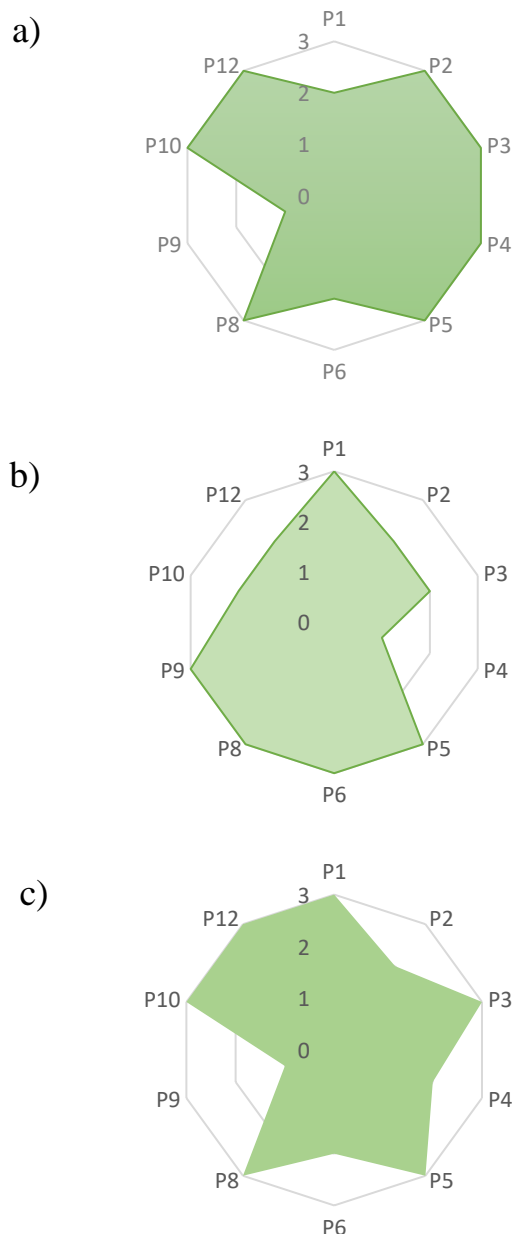


Figura 114: Diagramas *Green Star* para licuefacción enzimática vía α -amilasa utilizando a) enzimas libres b) PAAm-Amy-6 c) Alg-Amy-2.

6.3. Conclusiones Parciales

El análisis de sustentabilidad mediante *Eco-Scale* y *Green Star* para la reacción de licuefacción vía α -amilasa para enzimas libres e inmovilizadas (en hidrogeles y en alginato de sodio) muestra que, si bien la matriz de hidrogel proveniente de un material derivado del petróleo (no renovable), la reutilización y las excelentes cualidades catalíticas de las enzimas inmovilizadas en hidrogeles de poliacrilamida resultan en un sistemas con sustentabilidad similar al del proceso desarrollado en un catalizador inmovilizado en un polímero natural.

Sin bien ninguno de estos análisis es conclusivo, el estudio aporta una perspectiva diferente y global acerca de la sustentabilidad de los tres sistemas biocatalíticos comparados, remarcando fortalezas y debilidades de cada uno.

7. Conclusiones

Los hidrogeles de poliacrilamida ofrecen múltiples ventajas al implementarse como matrices de inmovilización para biocatalizadores (enzimas y levaduras) involucrados en la producción de bioetanol. El particular carácter monolítico y macroporoso de estos hidrogeles los hace especialmente adecuados para salvar tres dificultades, frente a otras matrices de inmovilización: la facilidad de reutilización, la mayor tolerancia del componente activo a condiciones medioambientales adversas y el atrapamiento del biocatalizador durante un periodo prolongado de tiempo.

Respecto a la cinética de reacciones enzimáticas utilizando catalizadores libres e inmovilizados, se determinaron los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten. Los valores de actividad enzimática, durante la reacción de hidrólisis y la reacción de licuefacción, pronostican una reacción inicial algo más lenta para enzimas α -amilasa y β -amilasa inmovilizadas en hidrogeles respecto a la enzima libre. Sin embargo, en cuanto a tiempos absolutos, esta disminución de velocidades no afecta el tiempo de operación del proceso global.

La posibilidad de reutilización marca una importante superioridad al momento de operar con enzimas inmovilizadas en hidrogeles respecto al uso de enzimas libres, ya que luego de cinco ciclos de reacción las enzimas continuaban activas y luego de diez ciclos de reutilización las enzimas α -amilasas experimentaron una disminución de actividad sólo de un 25-30 %. Similares resultados se obtuvieron para enzimas β -amilasa. En contraste, la inmovilización de enzimas en alginato de sodio arrojó resultados de velocidad máxima de reacción cercanos a los de enzimas libres, pero la baja a nula posibilidad de reutilización y las inadecuadas propiedades mecánicas de estos materiales los hacen poco apropiados para ser implementados en la producción de etanol. Finalmente, la incorporación de láminas de óxido de grafeno a los hidrogeles de poliacrilamida produjo un nanocompuesto que incrementó la eficiencia de inmovilización enzimática mejorando notablemente sus propiedades mecánicas.

Para la inmovilización de levaduras *S. cerevisiae* se utilizaron hidrogeles macroporosos de poliacrilamida sintetizados mediante crio-polimerización. La carga óptima de levaduras que fue posible incorporar al hidrogel resultó ser de 175 mg Sc mL⁻¹ solución. Respecto al proceso de producción de bioetanol, mediante el análisis de experiencias fermentativas (ciclos breves de fermentación) fue analizado el

comportamiento de levaduras inmovilizadas frente a cambios en distintas condiciones de reacción. El análisis de ciclos de fermentación a escala industrial (96 h de operación) arrojó resultados muy alentadores, ya que los catalizadores inmovilizados presentan la posibilidad operativa de ser reutilizados en hasta cinco ciclos de reacción probados y sin disminuir el rendimiento de etanol.

Finalmente, se propuso trabajar con un catalizador de tri-componente conteniendo enzimas y levaduras inmovilizadas simultáneamente. Fue demostrado que un único catalizador conteniendo cantidades óptimas de levaduras y enzimas inmovilizadas es capaz de realizar la conversión de almidón a etanol atravesando tres etapas de reacción: licuefacción, sacarificación y fermentación en un mismo bio-reactor y con una amplia versatilidad operativa. Las condiciones de operación más convenientes en cuanto a mayores respuestas en concentración y productividad volumétrica finales de etanol fueron determinadas estadísticamente mediante un Diseño de Experimentos. Este resultado podría sentar un precedente a la hora de implementar un proceso de producción de etanol *one-pot* a elevada temperatura (50 °C), lo que reduciría costos operativos y energéticos a nivel industrial. Por otro lado, esta flexibilidad operativa permitiría soportar fluctuaciones en las variables sin alterar significativamente los valores de producción finales.

El análisis de sustentabilidad mediante *Eco-Scale* y *Green Star* para la reacción de licuefacción vía α -amilasa para enzimas libres e inmovilizadas (en hidrogeles y en alginato de sodio) muestra que, a pesar que la matriz de hidrogel proviene de un material derivado del petróleo, la reutilización y las excelentes cualidades catalíticas de las enzimas inmovilizadas en hidrogeles de poliacrilamida resultan en un sistemas de una sustentabilidad similar al del proceso desarrollado en un catalizador inmovilizado en un polímero natural.

Anexo I: Otros Materiales como Matrices de Inmovilización

I.1. Síntesis de otros Hidrogeles Derivados de Monómeros Vinílicos

I.1.1. Síntesis y Selección de Hidrogeles como Matrices de Inmovilización

Fueron sintetizados a modo exploratorio una gran diversidad de hidrogeles procedentes de monómeros vinílicos variando la concentración del monómero principal, co-monómeros y el porcentaje de agente entrecruzante. Una vez sintetizados los mismos se procedió a seleccionar los hidrogeles más aptos para utilizarse como matrices de inmovilización. Por lo tanto, se estableció una serie de criterios simples que permiten descartar sistemáticamente algunos de los materiales sintetizados. Estos criterios son: resistencia mecánica, resistencia química, capacidad de incorporación-liberación de componentes activos y costos económicos de insumos.

Para mayor claridad sólo fueron presentados en el cuerpo principal de la tesis los hidrogeles que presentaron cualidades deseadas para la aplicación buscada.

Los monómeros, co-monómeros y demás reactivos utilizados fueron los presentados en la Sección 2.7.2 del Capítulo 2.

I.1.2. Síntesis de hidrogeles PNIPAM, PNIPAM-co-AMPS y PNIPAM-co- HMA

Para la síntesis de hidrogeles de poli-(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) se utilizó N-isopropilacrilamida (NIPAM), como precursor monomérico. Como agente entrecruzante o *cross-linker* se utilizó N,N-metilen bisacrilamida (BIS) en dos relaciones molares diferentes 0,02: 1 y 0,04:1, ambos basada en monómero. La polimerización por radicales libres se inició con el sistema iniciador redox: persulfato de amonio (APS) y N,N,N',N'- tetrametilendiamina (TEMED, 10 mL L⁻¹).

En el caso de los hidrogeles de poli-N-isopropilacrilamida co-polimerizados con AMPS (PNIPAM-co-AMPS) se adicionó, además de los reactivos químicos mencionados, el co-monómero AMPS en relación molar 0,02: 1, basada en el monómero. Similarmente, para hidrogeles de poli-N-isopropilacrilamida co-polimerizados con HMA (NIPAM-co-HMA) se utilizó HMA en relación molar 0,03:1 y 0,05:1, basada en el monómero.

Todos reactivos químicos (NIPAM, AMPS, BIS, APS) excepto TEMED se disolvieron en una solución buffer de fosfato (PBS: 0,1 M, pH 5,8) para constituir la denominada mezcla pre-gelificante (PGM).

Los hidrogeles gelificaron en moldes cilíndricos de 1 cm de diámetro y una vez formados se almacenaron durante 24 h a temperatura ambiente hasta alcanzar el equilibrio de reacción. A continuación, se cortaron en discos cilíndricos de aproximadamente 1,5 mm de espesor, se lavaron con agua destilada y se secaron durante 48 h a temperatura ambiente y vacío moderado (0,1 atm) para posterior uso.

I.1.3. Síntesis de hidrogeles de PAAm y PAAm-co-AA

Para la síntesis de hidrogeles de poli-acrilamida (PAAm) se utilizó acrilamida, como precursor monomérico. Como agente entrecruzante o *cross-linker* se utilizó N,N-metilen-bisacrilamida (BIS) en dos relaciones molares diferentes 0,02: 1 y 0,04:1, ambos basada en monómero.

La polimerización por radicales libres se inició con el sistema iniciador redox persulfato de amonio (APS) y N,N,N',N'- tetrametilendiamina (TEMED, 10 mL L⁻¹). Se adicionó, además de los reactivos químicos mencionados, el co-monómero ácido acrílico (AA) en relación molar 0,01: 1, 0,03: 1 y 0,05: 1 basada en el monómero. Similarmente, para hidrogeles de poli-N-isopropilacrilamida co-polimerizados con HMA (AAm-co-HMA) se utilizó el co-monómero HMA en relación molar 0,03:1 y 0,05:1, basada en el monómero.

Todos los reactivos químicos (AAm, BIS, APS) excepto TEMED se disolvieron en una solución buffer de fosfato para constituir la denominada mezcla pre-gelificante (PGM). Se dejó reaccionar durante 24 h a temperatura ambiente en moldes cilíndricos de 1 cm de diámetro. A continuación, se cortaron en discos cilíndricos de aproximadamente 1,5 mm de espesor, se lavaron con agua destilada y se secaron durante 48 h a temperatura ambiente y vacío moderado (0,1 atm) para posterior uso.

Los hidrogeles sintetizados se presentan en la

Tabla 42.

Tabla 42: Composición molar de hidrogeles de poli-acrilamida y derivados vinílicos.

Materiales	AAM, M	NIPAM, M	AMPS, %	AA, %	HMA, %	BIS, %
<i>HG-1</i>	0,5	-	-	-	-	2
<i>HG-2</i>	1,0	-	-	-	-	2
<i>HG-3</i>	1,5	-	-	-	-	2
<i>HG-4</i>	2,0	-	-	-	-	2
<i>HG-5</i>	0,5	-	-	1	-	2
<i>HG-6</i>	1,0	-	-	1	-	2
<i>HG-7</i>	0,5	-	-	3	-	2
<i>HG-8</i>	1,0	-	-	3	-	2
<i>HG-9</i>	0,5	-	-	5	-	2
<i>HG-10</i>	1,0	-	-	5	-	2
<i>HG-11</i>	-	0,5	-	-	-	2
<i>HG-12</i>	-	1,0	-	-	-	2
<i>HG-13</i>	-	1,5	-	-	-	2
<i>HG-14</i>	-	0,5	2	-	-	2
<i>HG-15</i>	-	1,0	2	-	-	2
<i>HG-16</i>	-	1,5	2	-	-	2
<i>HG-17</i>	-	0,5	-	-	-	4
<i>HG-18</i>	-	1,0	-	-	-	4
<i>HG-19</i>	-	1,5	-	-	-	4
<i>HG-20</i>	-	0,5	2	-	-	4
<i>HG-21</i>	-	1,0	2	-	-	4
<i>HG-22</i>	-	1,5	2	-	-	4
<i>HG-23</i>	-	0,5	2	-	5	2
<i>HG-24</i>	-	1	2	-	5	2
<i>HG-25</i>	-	1,5	2	-	5	2

I.2. Criterios de Selección de Matrices de Inmovilización

I.2.1. Criterio I: Resistencia Mecánica

Como criterio de selección inicial fue analizada la estabilidad mecánica del hidrogel sintetizado, esto es debido a que en una futura aplicación estos materiales deberán ser incorporados a un reactor industrial y la matriz deberá ser mecánicamente estable de forma de soportar las condiciones de agitación y mezclado requeridos por el proceso. Una vez lavados y secados los hidrogeles se colocaron en soluciones de buffers durante 48 h a temperatura ambiente.

Debido a que la recuperación de las matrices de inmovilización, durante el proceso de bioetanol, involucra técnicas de percolación o filtrado, el hidrogel soporte debe ser flexible, pero manipulable y poco frágil. Se consideran hidrogeles resistentes a aquellos que soportan su estado hinchado en equilibrio sin romperse durante 48 h. (Caykara, Kiper y Demirel, 2006)

Teniendo en cuenta esta condición, fueron descartados geles con hinchamiento mayor a 3000 y menor a 500. Asimismo fueron también descartados hidrogeles con un porcentaje de agente entrecruzante mayor al 2 %, por resultar materiales altamente compactos y frágiles. (Karada, Uzum y Saraydin, 2002)

I.2.2. Criterio II: Resistencia Química

Fue observada la estabilidad química de los hidrogeles sintetizados exponiéndolos a las condiciones correspondientes a las reacciones de hidrólisis-sacarificación y fermentación y analizando su estado durante 24 h. Las condiciones de reacción se resumen a continuación, en la Tabla 43.

Tabla 43: Condiciones operativas de las reacciones de producción de bioetanol

Reacción Química	Temperatura	Temp. Máxima	pH
Hidrólisis	50 °C	60 °C	5,5-5,8
Sacarificación	55 °C	60 °C	5,5-5,8
Fermentación	40-42 °C	45 °C	7,0-7,2

En la primera columna de la Tabla 43 se detallan las temperaturas óptimas de trabajo y en la segunda las temperaturas máximas soportables por los componentes activos en suspensión. Tal como se mencionó en los Capítulos 3 y 4, por arriba de los 60 °C las enzimas se desnaturalizan y pierden su estructura cuaternaria, en forma reversible o, en algunos casos, permanentemente. Por otro lado, las levaduras se ven sometidas a estrés por encima de los 45 °C, generándose la inhibición de las mismas, y en consecuencia la interrupción de la producción de etanol.

Fueron descartados hidrogeles con LCST menor a 50 °C o pH cercano a 5, porque en esas condiciones se induce una transición de fase desde su estado hinchado a colapsado provocando la liberación de las enzimas, lo que disminuye su potencial reutilización.

I.2.3. Criterio III: Capacidad de Incorporación-Liberación de Componentes Activos

Se colocó el hidrogel puro y seco en un volumen conocido de soluciones diluidas de enzimas, en buffer de PBS, por 24 h. Se midió la absorbancia de la solución en función del tiempo a 290 nm. Fue establecido el siguiente criterio de selección:

$A_{oR} > A_{fR} \rightarrow$ Hidrogel muy apto para inmovilización enzimática

$A_{oR} = A_{fR} \rightarrow$ Hidrogel apto para inmovilización enzimática

$A_{oR} < A_{fR} \rightarrow$ Hidrogel No apto para encapsulación enzimática

Donde:

A_{oR} = Absorbancia de la solución inicial, $t_o = 0$ h

A_{fR} = Absorbancia de la solución final, $t_f = 24$ hs

Análogamente, se estudió la liberación del componente activo. El hidrogel previamente en contacto con la solución enzimática en dilución 1:10 de α -amilasa respecto a buffer, durante 24 h. Se midió la absorbancia de la solución en función del tiempo a 290 nm. Fue establecido el siguiente criterio de selección:

$A_{oL} < A_{fL} \rightarrow$ Hidrogel no apto para encapsulación enzimática.

$A_{oL} = A_{fL} \rightarrow$ Hidrogel apto para encapsulación enzimática.

$A_{oL} = A_{fL} \rightarrow$ Hidrogel muy apto para encapsulación enzimática.

Donde:

A_{oL} = Absorbancia de liberación inicial, $t_o = 0$ h

$$A_{fL} = \text{Absorbancia de liberación final}, \quad t_f = 24 \text{ h}$$

Este criterio de selección se utilizó únicamente para seleccionar/descartar geles para inmovilizar enzimas dado que el tamaño de poro del hidrogel es del orden de la micra. Mientras que en caso de células de levaduras *S. cerevisiae* son similar orden de magnitud que los poros de la matriz, esto dificulta de forma importante su difusión.

Los resultados se muestran en la Tabla 44, los hidrogeles ensayados fueron hidrogeles de PAAm y PAAm-co-AA, los cuales demostraron mantener un comportamiento análogo.

Tabla 44: Ensayos de retención-liberación enzimática de hidrogeles

Material	AAM, M	AA, %	BIS, %	AoR (290 nm)	AoR (290 nm)	AoL (290 nm)	AoL (290 nm)
HG-1	0,5	-	2	0,655	0,622	0,000	0,122
HG-2	1	-	2	0,665	0,625	0,000	0,135
HG-5	0,5	1	2	0,665	0,661	0,000	-
HG-6	1	1	2	0,664	0,656	0,000	0,154

I.2.4. Criterio IV: Costos Económicos de Insumos

Como último criterio y, frente a la paridad de las restantes condiciones, se utilizó el hidrogel cuya fuente sea la más económica, en caso de ser factible su selección.

Teniendo en cuenta los criterios establecidos fueron pre-seleccionados como soportes de inmovilización los siguientes hidrogeles:

- 1 M AAm – 2 % BIS
- 1,5 M AAm – 2 % BIS
- 1 M AAm-co-1 % AA – 2 % BIS
- 1,5 M AAm-co-1 % AA – 2 % BIS

Para inmovilización celular también podrían utilizarse:

- 1 M NIPAM – 2 % BIS
- 1,5 M NIPAM – 2 % BIS

La Tabla 45 resume la selección de hidrogeles en función de los criterios establecidos.

Tabla 45: Selección de hidrogeles sintetizados de poli-acrilamida y derivados vinílicos

Materiales	AAm, M	NIPAM, M	AMPS, % M	AA, % M	HMA, % M	BIS, % M	Selección PAAm-Amy	Selección PAAm-Sc
HG-1	0,5	-	-	-	-	2	✗	✗
HG-2	1	-	-	-	-	2	✓	✓
HG-3	1,5	-	-	-	-	2	✓	✓
HG-4	2	-	-	-	-	2	✗	✗
HG-5	0,5	-	-	1	-	2	✗	✗
HG-6	1	-	-	1	-	2	✓	✗
HG-7	0,5	-	-	3	-	2	✗	✗
HG-8	1	-	-	3	-	2	✗	✗
HG-9	0,5	-	-	5	-	2	✗	✗
HG-10	1	-	-	5	-	2	✗	✗
HG-11	-	0,5	-	-	-	2	✗	✗
HG-12	-	1	-	-	-	2	✗	✓
HG-13	-	1,5	-	-	-	2	✗	✓
HG-14	-	0,5	2	-	-	2	✗	✗
HG-15	-	1	2	-	-	2	✗	✗
HG-16	-	1,5	2	-	-	2	✗	✗
HG-17	-	0,5	-	-	-	4	✗	✗
HG-18	-	1	-	-	-	4	✗	✗
HG-19	-	1,5	-	-	-	4	✗	✗
HG-20	-	0,5	2	-	-	4	✗	✗
HG-21	-	1	2	-	-	4	✗	✗
HG-22	-	1,5	2	-	-	4	✗	✗
HG-23	-	0,5	2	-	5	2	✗	✗
HG-24	-	1	2	-	5	2	✗	✗
HG-25	-	1,5	2	-	5	2	✗	✗

Anexo II: Soluciones Buffer

Buffer Citrato (pH 4,0-4,2)

Solución A: Se disolvieron 10,5 g ácido cítrico monohidratado (Sigma- Aldrich) en 500 mL de agua destilada para obtener una solución 0,1 M.

Solución B: NaOH (Fluka) 1 M.

Se mezclaron las soluciones A y B en una proporción 5:1. Luego esta solución fue acidificada con ácido clorhídrico (HCl, Fluka) 1 M a pH 4,2. Se enrazó a volumen final deseado con H₂O destilada.

Buffer Fosfato I (pH 5,5-5,8)

Solución A: Se disolvieron disolver 27,6 g de NaH₂PO₄·H₂O (Sigma- Aldrich) enrazar a 1000 mL con agua destilada.

Solución B: Se disolvieron 53,65 g de Na₂HPO₄·7 H₂O (Sigma- Aldrich) enrazar a 1000 mL con agua destilada.

Solución reguladora de fuerza iónica: Para mantener la fuerza iónica constante se adicionaron KH₂PO₄ 2,0 g L⁻¹, MgSO₄·7 H₂O 1,0 g L⁻¹ y (NH₄)₂SO₄ 1,0 g L⁻¹.

Para obtener un buffer de fosfato de pH 5,8 se mezclaron aproximadamente 460 mL de la Solución A con 40 mL de Solución B. Se enrazó a 1000 mL con H₂O.

Buffer Fosfato II (pH 7,0-7,2)

Se utilizan las mismas soluciones que para Buffer Fosfato (pH 5,8)

Para obtener un buffer de fosfato de pH 5,8 se mezclaron aproximadamente 140 mL de la Solución A con 360 mL de Solución B. Se enrazó a 1000 mL con H₂O.

Buffer Tris (pH 7,2-7,5)

Solución A: Solución 0,2 M de Tris. Se disolvieron 6,05 g de base tris (hidroximetil) amino metano (Sigma- Aldrich) en 30 ml de H₂O destilada, se enrazó a 50 ml con H₂O destilada.

Solución B: HCl (Fluka) 1 N.

Se ajustó el pH a 7,2 con la solución B. Se enrazó a volumen final deseado con H₂O destilada.

Anexo III: Puntos de Penalización de *Eco-Scale*

YIELD
(100 - % yield) / 2

PRICE OF REACTION COMPONENTS (to obtain 10 mmol of product)	
Parameter	Penalty Points
Inexpensive (< € 10)	0
Expensive (> € 10 and < € 50)	3
Epcensive (> € 50)	5

SAFETY	
Parameter	Penalty Points
N (Dangerous for environment)	5
T (Toxic)	5
F (Highly Flamable)	5
E (Explosive)	10
F + (Extremely Flamable)	10
T+ (ExtremelyToxic)	10

TECHNICAL SET-UP	
Parameter	Penalty Points
Common or Flow-through	0
Controlled addition of chemicals	1
Unconventional activation	2
Pressure equipment (> 1 bar)	3
Special glassware	1
Gas atmosphere	1
Glove box	3

TEMPERATURE/TIME (Energy)	
Parameter	Penalty Points
Room temperature, < 1 h	0
Room temperature, < 24 h	1
Room temperature, > 24 h	2
Heating, < 1 h	2
Heating, > 1 h	3
Cooling to 0°C	4
Cooling bellow 0°C	5

WORK-UP/PURIFICATION	
Parameter	Penalty Points
None	0
Cooling to room temperature	0
Addition solvent	0
Simple filtration	0
Removal of solvent (bp < 150 °C)	0
Removal of solvent (bp > 150 °C)	2
Crystallization/ Filtration	1
Solid phase extraction (SPE)	2
Distillation	3
Sublimation	3
Liquid-liquid extraction	3
Classical chromatography	10

Referencias

- Abreu, L. F. and Fariai, J. (2007) 'Temperature and ascorbic acid effects in physico-chemical stability and enzymatic activity of coconut water (*Cocos nucifera* L.) aseptic filled', *Ciencia E Tecnologia De Alimentos*, 27, pp. 226–232.
- Aditiya, H. B., Mahlia, T. M. I., Chong, W. T., Nur, H. and Sebayang, A. H. (2016) 'Second generation bioethanol production: A critical review', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, pp. 631–653. doi: 10.1016/j.rser.2016.07.015.
- Van Aken, K., Streckowski, L. and Patiny, L. (2006) 'EcoScale, a semi-quantitative tool to select an organic preparation based on economical and ecological parameters', *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2, doi: 10.1186/1860-5397-2-3.
- Al-Sabagh, A. M., Kandile, N. G., El-Ghazawy, R. A., Noor El-Din, M. R. and El-sharaky, E. A. (2013) 'Synthesis and characterization of high molecular weight hydrophobically modified polyacrylamide nanolatexes using novel nonionic polymerizable surfactants', *Egyptian Journal of Petroleum*, 22(4), pp. 531–538. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpe.2013.11.007>.
- Alves, E. A. and Guimarães, A. C. R. (2009) 'Cultivo celular', in *Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde*, pp. 216–253.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M. and Negro, M. J. (2010) 'Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review', *Bioresource Technology*, 101(13), pp. 4851–4861. doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.093.
- Ammar, A., Al-Enizi, A. M., AlMaadeed, M. A. and Karim, A. (2016) 'Influence of graphene oxide on mechanical, morphological, barrier, and electrical properties of polymer membranes', *Arabian Journal of Chemistry*, 9(2), pp. 274–286. doi: 10.1016/j.arabjc.2015.07.006.
- Amorim, H. V., Lopes, M. L., De Castro Oliveira, J. V., Buckeridge, M. S. and Goldman, G. H. (2011) 'Scientific challenges of bioethanol production in Brazil', *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp. 1267–1275. doi: 10.1007/s00253-011-3437-6.
- Anastas, P. T. and Warner, J. C. (1998) '12 Principles of Green Chemistry', *Green Chemistry: Theory and Practice*, p. 30.
- Ariyajoenwong, P., Laopaiboon, P., Jaisil, P. and Laopaiboon, L. (2012) 'Repeated-batch ethanol production from sweet sorghum juice by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on sweet sorghum stalks', *Energies*, 5(4), pp. 1215–1228. doi: 10.3390/en5041215.
- Ariyajoenwong, P., Laopaiboon, P., Salakkam, A., Srinophakun, P. and Laopaiboon, L. (2016) 'Kinetic models for batch and continuous ethanol fermentation from sweet sorghum juice by yeast immobilized on sweet sorghum stalks', *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 66, pp. 210–216. doi: 10.1016/j.jtice.2016.06.023.
- Arnold, S. F. (2006) *Design of Experiments with MINITAB*, *The American Statistician*. doi: 10.1198/tas.2006.s46.
- Ashton, R. S., Banerjee, A., Punyani, S., Schaffer, D. V. and Kane, R. S. (2007) 'Scaffolds based on degradable alginate hydrogels and poly(lactide-co-glycolide) microspheres for stem cell culture', *Biomaterials*, 28(36), pp. 5518–5525. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.08.038.
- Ateş, S. and Mehmetoğlu, Ü. (1997) 'A new method for immobilization of β -galactosidase and its utilization in a plug flow reactor', *Process Biochemistry*, 32(5), pp. 433–436. doi: 10.1016/S0032-9592(96)00101-X.

- Babrzadeh, F., Jalili, R., Wang, C., Shokralla, S., Pierce, S., Robinson-Mosher, A., Nyren, P., Shafer, R. W., Basso, L. C., De Amorim, H. V., De Oliveira, A. J., Davis, R. W., Ronaghi, M., Gharizadeh, B. and Stambuk, B. U. (2012) 'Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1', *Molecular Genetics and Genomics*, 287(6), pp. 485–494. doi: 10.1007/s00438-012-0695-7.
- Bae, Y. H., Okano, T. and Kim, S. W. (1989) 'Insulin permeation through thermo-sensitive hydrogels', *Journal of Controlled Release*, 9(3), pp. 271–279. doi: 10.1016/0168-3659(89)90096-5.
- Bajpai, P. (2013) *Production of Bioethanol, Advances in Bioethanol*. doi: 10.1007/978-81-322-1584-4.
- Baker, J. P., Stephens, D. R., Blanch, H. W. and Prausnitz, J. M. (1992) 'Swelling equilibria for acrylamide-based polyampholyte hydrogels', *Macromolecules*. American Chemical Society, 25(7), pp. 1955–1958. doi: 10.1021/ma00033a019.
- Balat, M. (2011) 'Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review', *Energy Conversion and Management*, pp. 858–875. doi: 10.1016/j.enconman.2010.08.013.
- Basso, L. C., De Amorim, H. V., De Oliveira, A. J. and Lopes, M. L. (2008) 'Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil', in *FEMS Yeast Research*, pp. 1155–1163. doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. and Stryer, L. (2013) *Biochemistry*, W H Freeman. Available at: papers2://publication/uuid/7EB6183C-F1A3-4903-A72F-B1A659CECF68.
- Bicas, J. L., Kleinegris, D. M. M. and Barbosa, M. J. (2015) 'Use of methylene blue uptake for assessing cell viability of colony-forming microalgae', *Algal Research*, 8, pp. 174–180. doi: 10.1016/j.algal.2015.02.004.
- Binod, P., Janu, K. U., Sindhu, R. and Pandey, A. (2011) 'Hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production', in *Biofuels*, pp. 229–250. doi: 10.1016/B978-0-12-385099-7.00010-3.
- Binod, P., Sindhu, R., Singhania, R. R., Vikram, S., Devi, L., Nagalakshmi, S., Kurien, N., Sukumaran, R. K. and Pandey, A. (2010) 'Bioethanol production from rice straw: An overview', *Bioresource Technology*, 101(13), pp. 4767–4774. doi: 10.1016/j.biortech.2009.10.079.
- Blaho, D. (2007) 'Physical Chemistry for the Biological Sciences', *The Yale journal of biology and medicine*, 80(2), p. 94. Available at: <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=iND9qjGHCFYC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Physical+Chemistry+for+the+chemical+and+biological+sciences&ots=nBpSOtDKDx&sig=iBbGEWvu8Q0X116MZDZCR757214>.
- Boronat Gil, R., Pedro, J. and Pérez, L. (2011) 'El estudio de la fermentación en el laboratorio de educación secundaria', *Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias*, 8(1), pp. 111–114. Available at: <http://hdl.handle.net/10498/10210%5Cnhttp://reuredc.uca.es>.
- Borowitzka, M. A. and Moheimani, N. R. (2013) 'Sustainable biofuels from algae', *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 18(1), pp. 13–25. doi: 10.1007/s11027-010-9271-9.
- Bott, R. (2014) *Brock Biology of Microorganisms, 14th Edition- Madigan, Igarss 2014*. doi: 10.1007/s13398-014-0173-7.2.
- Brady, D. and Jordaan, J. (2009) 'Advances in enzyme immobilisation', *Biotechnology Letters*, pp. 1639–1650. doi: 10.1007/s10529-009-0076-4.
- Brøndsted, H. and Kopeček, J. (1991) 'Hydrogels for site-specific oral drug delivery: synthesis and characterization', *Biomaterials*, 12(6), pp. 584–592. doi: 10.1016/0142-9612(91)90056-G.
- Bul?on, A., Colonna, P., Planchot, V. and Ball, S. (1998) 'Starch granules: Structure and biosynthesis',

- International Journal of Biological Macromolecules*, pp. 85–112. doi: 10.1016/S0141-8130(98)00040-3.
- Burczak, K., Gamian, E. and Kochman, A. (1996) 'Long-term in vivo performance and biocompatibility of poly(vinyl alcohol) hydrogel macrocapsules for hybrid-type artificial pancreas', *Biomaterials*, 17(24), pp. 2351–2356. doi: 10.1016/S0142-9612(96)00076-2.
- Buthe, A. (2011) 'Entrapment of enzymes in nanoporous sol-gels.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 743, pp. 223–237. doi: 10.1007/978-1-61779-132-1_18.
- Cardona, C. A. and Orrego, C. E. (2009) *Avances Investigativos en la producción de Biocombustibles, Madrid, España. Mundi-Prensa. Available at: http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:BIOCOMBUSTIBLES#1.*
- Carrillo, L., Audisio, C., Bejarano, N., Molina, S., Ancasi, G. and Benítez, M. (2007) 'Levaduras', *Manual de Microbiología de los Alimentos*, (1), p. 40.
- Caykara, T., Kiper, S. and Demirel, G. (2006) 'Thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide) hydrogels: Synthesis, swelling and interaction with ionic surfactants', *European Polymer Journal*, 42(2), pp. 348–355. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2005.07.006.
- Chan, L. W., Lee, H. Y. and Heng, P. W. S. (2002) 'Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method', *International Journal of Pharmaceutics*, 242(1–2), pp. 259–262. doi: 10.1016/S0378-5173(02)00170-9.
- Chen, J., Yao, B., Li, C. and Shi, G. (2013) 'An improved Hummers method for eco-friendly synthesis of graphene oxide', *Carbon*, 64, pp. 225–229. doi: 10.1016/j.carbon.2013.07.055.
- Chen, X., Tao, L., Shekiri, J., Mohaghghi, A., Decker, S., Wang, W., Smith, H., Park, S., Himmel, M. E. and Tucker, M. (2012) 'Improved ethanol yield and reduced Minimum Ethanol Selling Price (MESP) by modifying low severity dilute acid pretreatment with deacetylation and mechanical refining: 1) Experimental.', *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), p. 60. doi: 10.1186/1754-6834-5-60.
- Chen, Y. (2011) 'Development and application of co-culture for ethanol production by co-fermentation of glucose and xylose: A systematic review', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, pp. 581–597. doi: 10.1007/s10295-010-0894-3.
- Chu, L. Y., Xie, R., Ju, X. J. and Wang, W. (2013) *Smart hydrogel functional materials, Smart Hydrogel Functional Materials*. doi: 10.1007/978-3-642-39538-3.
- Chun, D. M. (2012) 'Review article: Replication studies in CALL research', *CALICO Journal*, 29(4), pp. 591–600.
- Creswell, J. W. (2009) *Research Design: Qualitative, Quantitative and Mixed Approaches (3rd Edition), Research Design: Qualitative, Quantitative, and Mixed Methods Approaches*. doi: 10.2307/1523157.
- Cristina, I. and Astudillo, P. a Z. (2010) 'Diseño Integral de Biorreactores Continuos de Tanque Agitado Aplicados a Procesos de Fermentación - Tesis Doctoral', *Doctor*.
- Cui, W. and Cheng, J. J. (2015) 'Growing duckweed for biofuel production: a review.', *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, 17 Suppl 1, pp. 16–23. doi: 10.1111/plb.12216.
- Demirbas, A. (2009) 'Biofuels securing the planet's future energy needs', *Energy Conversion and Management*, 50(9), pp. 2239–2249. doi: 10.1016/j.enconman.2009.05.010.
- Department of Genetics (2014) *Saccharomyces Genome Database, Stanford University*.
- Devore, J. L. (2013) *Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias, Journal of Chemical Information and Modeling*. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.

- Ding, J., Huang, X., Zhang, L., Zhao, N., Yang, D. and Zhang, K. (2009) 'Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp. 253–263. doi: 10.1007/s00253-009-2223-1.
- Dunn, G. (2005) 'Michaelis–Menten Equation', *Encyclopedia of Biostatistics*, (3), pp. 2–3. doi: 10.1002/0470011815.b2a07035.
- Efficiency, E. and Energy, R. (2009) 'Theoretical Ethanol Yield Calculator', *Renewable Energy*, (8), pp. 9–10.
- Ehrenstein, G. W., Riedel, G. and Trawiel, P. (2004) 'Chapter 6 Dynamic Mechanical Analysis', *Thermal Analysis of Plastics: Theory and Practice*, pp. 236–299.
- Elmer, P. (2005) *FT-IR Spectroscopy Attenuated Total Reflectance (ATR)*, *Technical Note*. Available at: http://www.utsr.utoronto.ca/~traceslab/ATR_FTIR (Accessed: 28 June 2017).
- Fahrenfort, J. (1961) 'Attenuated total reflection: A new principle for the production of useful infra-red reflection spectra of organic compounds', *Spectrochimica Acta*, 17(7), pp. 698–709. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0371-1951\(61\)80136-7](http://dx.doi.org/10.1016/0371-1951(61)80136-7).
- Fan, S., Chen, S., Tang, X., Xiao, Z., Deng, Q., Yao, P., Sun, Z., Zhang, Y. and Chen, C. (2015) 'Kinetic model of continuous ethanol fermentation in closed-circulating process with pervaporation membrane bioreactor by *Saccharomyces cerevisiae*', *Bioresource Technology*, 177, pp. 169–175. doi: 10.1016/j.biortech.2014.11.076.
- Farnworth, E. R. (2008) *Handbook of fermented functional foods, Processing*. doi: 10.1002/1521-3773(20010316)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C.
- Farrugia, G. and Balzan, R. (2012) 'Oxidative Stress and Programmed Cell Death in Yeast', *Frontiers in Oncology*, 2. doi: 10.3389/fonc.2012.00064.
- Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., da Silva, E. G. P., Portugal, L. A., dos Reis, P. S., Souza, A. S. and dos Santos, W. N. L. (2007) 'Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods', *Analytica Chimica Acta*, pp. 179–186. doi: 10.1016/j.aca.2007.07.011.
- Fischer, G. and Schrattenholzer, L. (2001) 'Global bioenergy potentials through 2050', *Biomass and Bioenergy*, 20(3), pp. 151–159. doi: 10.1016/S0961-9534(00)00074-X.
- Fischer, J. D., Holliday, G. L. and Thornton, J. M. (2010) 'The CoFactor database: Organic cofactors in enzyme catalysis', *Bioinformatics*, 26(19), pp. 2496–2497. doi: 10.1093/bioinformatics/btq442.
- Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O. and Samali, A. (2010) 'Cellular stress responses: Cell survival and cell death', *International Journal of Cell Biology*. doi: 10.1155/2010/214074.
- Galafassi, S., Toscano, M., Vigentini, I., Piškur, J. and Compagno, C. (2013) 'Osmotic stress response in the wine yeast *Dekkera bruxellensis*', *Food Microbiology*, 36(2), pp. 316–319. doi: 10.1016/j.fm.2013.06.011.
- Gallego Gil, C. M. (2007) *Influencia de la acidez volátil en el proceso de fermentación de la planta de alcohol del ingenio Risaralda S.A.* Universidad Tecnología de Pereira.
- Garrido A (2009) 'Actividad enzimática de la amilasa', *Actividad Enzimática*, pp. 1–5. Available at: www.monografias.com/...pdf900/...enzimatica-amilasa/actividad-enzimatica-amilasa.pdf.
- Gómez, C. (2012) 'Hongos. Mohos y levaduras', *Hongos y levaduras*, 106, pp. 106–106.
- González, J. A., Gallardo, C. S., Pombar, A. and Rodríguez, L. A. (2004) 'Determination of enzymatic

- activities in ecotypic *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts.’, *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.*, 3(5), pp. 743–750.
- Graham, N. B. and McNeill, M. E. (1984) ‘Hydrogels for controlled drug delivery’, *Biomaterials*, 5(1), pp. 27–36. doi: 10.1016/0142-9612(84)90063-2.
- Grayson, M. (2011) ‘Biofuels.’, *Nature*, 474, p. S1. doi: 10.1038/474S01a.
- Gupta, A. and Verma, J. P. (2015) ‘Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review’, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, pp. 550–567. doi: 10.1016/j.rser.2014.08.032.
- Gupta, M., Velayutham, P., Elbeshbishy, E., Hafez, H., Khafipour, E., Derakhshani, H., El Naggar, M. H., Levin, D. B. and Nakhla, G. (2014) ‘Co-fermentation of glucose, starch, and cellulose for mesophilic biohydrogen production’, *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(36), pp. 20958–20967. doi: 10.1016/j.ijhydene.2014.10.079.
- Hagberg, S. (1960) ‘A Rapid Method for Determining Alpha-Amylase Activity’, *Cereal Chemistry*, pp. 218–222. doi: 10.2136/sssaj1951.036159950015000C0088x.
- Harris, M. G., Azevedo, L. M., Milla, A., Sugimura, J. and Young, K. (1980) ‘Patient response to hydrogel contact lenses: a comparative study.’, *Journal of the American Optometric Association*, 51(3), pp. 207–10.
- Havlík, P., Schneider, U. A., Schmid, E., Böttcher, H., Fritz, S., Skalský, R., Aoki, K., Cara, S. De, Kindermann, G., Kraxner, F., Leduc, S., McCallum, I., Mosnier, A., Sauer, T. and Obersteiner, M. (2011) ‘Global land-use implications of first and second generation biofuel targets’, *Energy Policy*, 39(10), pp. 5690–5702. doi: 10.1016/j.enpol.2010.03.030.
- Hayashi, Y. (2016) ‘Pot economy and one-pot synthesis’, *Chem. Sci.*, 7(2), pp. 866–880. doi: 10.1039/C5SC02913A.
- Helena Curtis, N. Sue Barnes, Adriana Schnek, G. F. (2010) *Biología*. Editorial.
- Hernández Nodarse, M. T. (2007) ‘Tendencias actuales en la producción de bioetanol’, *Boletín Electrónico N° 08. Facultad de Ingeniería-Universidad Rafael Landívar*, (8), pp. 1–17. doi: 10.1016/0172-2190(89)90123-3.
- Hoare, T. R. and Kohane, D. S. (2008) ‘Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges’, *Polymer*. Elsevier Ltd, 49(8), pp. 1993–2007. doi: 10.1016/j.polymer.2008.01.027.
- Hoffman, A. S. (2012) ‘Hydrogels for biomedical applications’, *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., 64(SUPPL.), pp. 18–23. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.010.
- Hohmann, S. (2002) ‘Osmotic adaptation in yeast-control of the yeast osmolyte system’, *International Review of Cytology*, pp. 149–187. doi: 10.1016/S0074-7696(02)15008-X.
- Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F. and Stevanato, R. (2013) ‘Enzyme immobilization: An update’, *Journal of Chemical Biology*, pp. 185–205. doi: 10.1007/s12154-013-0102-9.
- Hummers, W. S. and Offeman, R. E. (1958) ‘Preparation of Graphitic Oxide’, *Journal of the American Chemical Society*, 80(6), pp. 1339–1339. doi: 10.1021/ja01539a017.
- Illanes, A. (2008) *Enzyme Biocatalysis, Structure*. doi: 10.1007/978-1-4020-8361-7.
- Illanes, A. (2008) *Enzyme biocatalysis: Principles and applications, Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. doi: 10.1007/978-1-4020-8361-7.
- JagadeeshBabu, P. E., Suresh Kumar, R. and Maheswari, B. (2011) ‘Synthesis and characterization of

- temperature sensitive P-NIPAM macro/micro hydrogels', *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. Elsevier B.V., 384(1–3), pp. 466–472. doi: 10.1016/j.colsurfa.2011.05.004.
- Jambo, S. A., Abdulla, R., Mohd Azhar, S. H., Marbawi, H., Gansau, J. A. and Ravindra, P. (2016) 'A review on third generation bioethanol feedstock', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, pp. 756–769. doi: 10.1016/j.rser.2016.07.064.
- Jamieson, D. J. (1998) 'Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.', *Yeast*, 14(16), pp. 1511–1527. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199812)14:16<1511::AID-YEA356>3.0.CO;2-S.
- Jiang, Y., Guo, C., Xia, H., Mahmood, I., Liu, C. and Liu, H. (2009) 'Magnetic nanoparticles supported ionic liquids for lipase immobilization: Enzyme activity in catalyzing esterification', *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58(1–4), pp. 103–109. doi: 10.1016/j.molcatb.2008.12.001.
- Johnson, K. A. (2013) 'A century of enzyme kinetic analysis, 1913 to 2013', *FEBS Letters*, pp. 2753–2766. doi: 10.1016/j.febslet.2013.07.012.
- Johnson, K. A. and Goody, R. S. (2011) 'The original Michaelis constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten Paper', *Biochemistry*, 50(39), pp. 8264–8269. doi: 10.1021/bi201284u.
- Kadajji, V. G. and Betageri, G. V. (2011) 'Water soluble polymers for pharmaceutical applications', *Polymers*, pp. 1972–2009. doi: 10.3390/polym3041972.
- Kang, H. W., Tabata, Y. and Ikada, Y. (1999) 'Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering.', *Biomaterials*, 20(14), pp. 1339–1344. doi: 10.1016/S0142-9612(99)00036-8.
- Karada, E., Uzum, O. B. and Saraydin, D. (2002) 'Swelling equilibria and dye adsorption studies of chemically crosslinked superabsorbent acrylamide / maleic acid hydrogels u m a , Dursun Saraydin', *European Polymer Journal*, 38, pp. 2133–2141. doi: 10.1016/S0014-3057(02)00117-9.
- Kleijnen, J. P. C. (2008) 'Design of experiments: Overview', in *Proceedings - Winter Simulation Conference*, pp. 479–488. doi: 10.1109/WSC.2008.4736103.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P. and Bohn, A. (2005) 'Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material', *Angewandte Chemie - International Edition*, pp. 3358–3393. doi: 10.1002/anie.200460587.
- Koh, L. P. and Ghazoul, J. (2008) 'Biofuels, biodiversity, and people: Understanding the conflicts and finding opportunities', *Biological Conservation*, pp. 2450–2460. doi: 10.1016/j.biocon.2008.08.005.
- Konwarh, R., Karak, N., Rai, S. K. and Mukherjee, A. K. (2009) 'Polymer-assisted iron oxide magnetic nanoparticle immobilized keratinase.', *Nanotechnology*, 20(22), p. 225107. doi: 10.1088/0957-4484/20/22/225107.
- Krajewska, B. (2004) 'Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review', *Enzyme and Microbial Technology*, pp. 126–139. doi: 10.1016/j.enzmictec.2003.12.013.
- Krantz, M., Nordlander, B., Valadi, H., Johansson, M., Gustafsson, L. and Hohmann, S. (2004) 'Anaerobicity prepares *Saccharomyces cerevisiae* cells for faster adaptation to osmotic shock', *Eukaryotic Cell*, 3(6), pp. 1381–1390. doi: 10.1128/EC.3.6.1381-1390.2004.
- Kricheldorf, H. R., Nuyken, O. and Swift, G. (2004) *Handbook of Polymer Synthesis, Makromolekulare Chemie*. doi: 10.1201/9781420030594.
- Kumar, V., Sharma, V. K. and Kalonia, D. S. (2005) 'Second derivative tryptophan fluorescence spectroscopy as a tool to characterize partially unfolded intermediates of proteins', *International Journal of Pharmaceutics*, 294(1–2), pp. 193–199. doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.01.024.
- Kwon, I. C., Bae, Y. H. and Kim, S. W. (1991) 'Electrically erodible polymer gel for controlled release of

- drugs', *Nature*, 354(6351), pp. 291–293. doi: 10.1038/354291a0.
- Laftah, W. A., Hashim, S. and Ibrahim, A. N. (2011) 'Polymer hydrogels: a review', *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 50, pp. 1475–1486. doi: 10.1080/03602559.2011.593082.
- Lagunas, R., Dominguez, C., Busturia, A. and Saez, M. J. (1982) 'Mechanisms of appearance of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*: Inactivation of sugar transport systems', *Journal of Bacteriology*, 152(1), pp. 19–25.
- Lee, K. Y. and Mooney, D. J. (2012) 'Alginate: Properties and biomedical applications', *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 37(1), pp. 106–126. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003.
- Lee, S. C., Kwon, I. K. and Park, K. (2013) 'Hydrogels for delivery of bioactive agents: A historical perspective', *Advanced Drug Delivery Reviews*, pp. 17–20. doi: 10.1016/j.addr.2012.07.015.
- Lee, W. S., Chen, I. C., Chang, C. H. and Yang, S. S. (2012) 'Bioethanol production from sweet potato by co-immobilization of saccharolytic molds and *Saccharomyces cerevisiae*', *Renewable Energy*, 39(1), pp. 216–222. doi: 10.1016/j.renene.2011.08.024.
- De Leon, A. C., Kidd, M. T. and Corzo, A. (2010) 'Box-Behnken Design: Alternative multivariate design in broiler nutrition research', *World's Poultry Science Journal*, 66(4), pp. 699–706. doi: 10.1017/S0043933910000668.
- Lesik, S. A. (2010) *Applied statistical inference with MINITAB, Statistics : textbooks and monographs*.
- Lim, F. and Sun, a. (1980) 'Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas', *Science*, 210(4472), pp. 908–910. doi: 10.1126/science.6776628.
- Lin, T., Lin, J. yi, Cui, S. hui and Cameron, S. (2009) 'Using a network framework to quantitatively select ecological indicators', *Ecological Indicators*, 9(6), pp. 1114–1120. doi: 10.1016/j.ecolind.2008.12.009.
- Liu, C. Z., Wang, F. and Ou-Yang, F. (2009) 'Ethanol fermentation in a magnetically fluidized bed reactor with immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in magnetic particles', *Bioresource Technology*, 100(2), pp. 878–882. doi: 10.1016/j.biortech.2008.07.016.
- Liu, Y. (2006) 'A simple thermodynamic approach for derivation of a general Monod equation for microbial growth', *Biochemical Engineering Journal*, 31(1), pp. 102–105. doi: 10.1016/j.bej.2006.05.022.
- Manchester, K. L. (2007) 'Louis Pasteur, fermentation, and a rival', *South African Journal of Science*, pp. 377–380.
- Martin (1000) 'Two-way ANOVA and ANCOVA', *None*, pp. 1–6. doi: 10.1002/9781118491683.
- Martínez, M. V., Abel, S. B., Rivero, R., Miras, M. C., Rivarola, C. R. and Barbero, C. A. (2015) 'Polymeric nanocomposites made of a conductive polymer and a thermosensitive hydrogel: Strong effect of the preparation procedure on the properties', *Polymer*. Elsevier Ltd, 78, pp. 94–103. doi: 10.1016/j.polymer.2015.09.054.
- Mascarelli, A. L. (2009) 'Algae: Fuel of the future', *Environmental Science and Technology*, pp. 7160–7161. doi: 10.1021/es902509d.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. and Fernandez-Lafuente, R. (2007) 'Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques', *Enzyme and Microbial Technology*, pp. 1451–1463. doi: 10.1016/j.enzmictec.2007.01.018.
- McIntire, S. L. (2010) 'Ethanol', *WormBook*, pp. 1–6. doi: 10.1895/wormbook.1.40.1.
- Menard, H. P. (2008) 'Dynamic mechanical analysis', *Taylor & Francis*, pp. 269–74. doi:

10.1016/j.jmbbm.2010.10.005.

Menczel, J. D. and Prime, R. B. (2008) *Thermal Analysis of Polymers: Fundamentals and Applications*, *Thermal Analysis of Polymers: Fundamentals and Applications*. doi: 10.1002/9780470423837.

Menon, V. and Rao, M. (2012) 'Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept', *Progress in Energy and Combustion Science*, pp. 522–550. doi: 10.1016/j.pecs.2012.02.002.

Meyer, L. N. (2007) *Effect of Immobilization Method on Activity of Alpha-Amylase, Enzyme*.

Miyazaki, T., Yamaoka, K., Kaneko, T., Gong, J. P. and Osada, Y. (2000) 'Hydrogels with the ordered structures', *Science and Technology of Advanced Materials*, 1(4), pp. 201–210. doi: 10.1016/S1468-6996(01)00002-X.

Mohnen, D. (2008) 'Pectin structure and biosynthesis', *Current Opinion in Plant Biology*, pp. 266–277. doi: 10.1016/j.pbi.2008.03.006.

Molina, M. (2011) *Desarrollo de nano-compuestos basados en hidrogeles inteligentes y nano-objetos*. Universidad Nacional de Rio Cuarto.

Moon, C. P. and Fleming, K. G. (2011) 'Using tryptophan fluorescence to measure the stability of membrane proteins folded in liposomes', *Methods in Enzymology*, pp. 189–211. doi: 10.1016/B978-0-12-381268-1.00018-5.

Moyano, F., Setien, E., Silber, J. J. and Correa, N. M. (2013) 'Enzymatic Hydrolysis of N-Benzoyl-L-Tyrosine p-Nitroanilide by α -Chymotrypsin in DMSO-Water/AOT/n-Heptane Reverse Micelles. A Unique Interfacial Effect on the Enzymatic Activity', *Langmuir*, 29(26), pp. 8245–8254. doi: 10.1021/la401103q.

Mulko, L., Yslas, E., Bongiovanni Abel, S., Rivarola, C., Barbero, C., Acevedo, D. (2017) 'Smart Hydrogels: Application in bioethanol production', in.

Mulko, L., Rivarola, C. R. C. R., Barbero, C. A. C. A. and Acevedo, D. F. D. F. (2016) 'Bioethanol production by reusable *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in a macroporous monolithic hydrogel matrices', *Journal of Biotechnology*, 233, pp. 56–65. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.07.004.

Müller, M., Becher, J., Schnabelrauch, M. and Zenobi-Wong, M. (2015) 'Nanostructured Pluronic hydrogels as bioinks for 3D bioprinting.', *Biofabrication*, 7(3), p. 35006. doi: 10.1088/1758-5090/7/3/035006.

Murray, R. K. and Davis, J. C. (2003) *Harper's Illustrated Biochemistry, Molecular Physiology*. doi: 10.1016/0307-4412(88)90029-5.

Nación, L. (2016) *El uso de biocombustibles está en crecimiento, Domingo 24 de Enero*. Available at: <http://www.lanacion.com.ar/1864609-el-uso-de-biocombustibles-esta-en-crecimiento>.

Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K. and Dalai, A. K. (2010) 'Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, pp. 578–597. doi: 10.1016/j.rser.2009.10.003.

Najafpour, G., Younesi, H. and Ku Ismail, K. S. (2004) 'Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*', *Bioresource Technology*, 92(3), pp. 251–260. doi: 10.1016/j.biortech.2003.09.009.

Nesrinne, S. and Djamel, A. (2013) 'Synthesis, characterization and rheological behavior of pH sensitive poly(acrylamide-co-acrylic acid) hydrogels', *Arabian Journal of Chemistry*. doi: 10.1016/j.arabjc.2013.11.027.

Neves, P. V., Pitarelo, A. P. and Ramos, L. P. (2016) 'Production of cellulosic ethanol from sugarcane bagasse

- by steam explosion: Effect of extractives content, acid catalysis and different fermentation technologies', *Bioresource Technology*, 208, pp. 184–194. doi: 10.1016/j.biortech.2016.02.085.
- Nigam, P. S. and Singh, A. (2011) 'Production of liquid biofuels from renewable resources', *Progress in Energy and Combustion Science*, pp. 52–68. doi: 10.1016/j.pecs.2010.01.003.
- Nikolić, S., Mojović, L., Pejin, D., Rakin, M. and Vukacinović, M. (2010) 'Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*', *Biomass and Bioenergy*, 34(10), pp. 1449–1456. doi: 10.1016/j.biombioe.2010.04.008.
- Nikolić, S., Mojović, L., Rakin, M. and Pejin, D. (2009) 'Bioethanol production from corn meal by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*', *Fuel*, 88(9), pp. 1602–1607. doi: 10.1016/j.fuel.2008.12.019.
- Ostrander, D. B. and Gorman, J. A. (1999) 'The extracellular domain of the *Saccharomyces cerevisiae* sln1p membrane osmolarity sensor is necessary for kinase activity', *Journal of Bacteriology*, 181(8), pp. 2527–2534.
- Öztop, H. N., Öztop, a. Y., Karadağ, E., Işıkver, Y. and Saraydin, D. (2003) 'Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* on to acrylamide-sodium acrylate hydrogels for production of ethyl alcohol', *Enzyme and Microbial Technology*, 32(1), pp. 114–119. doi: 10.1016/S0141-0229(02)00244-2.
- Papong, S. and Malakul, P. (2010) 'Life-cycle energy and environmental analysis of bioethanol production from cassava in Thailand', in *Bioresource Technology*. doi: 10.1016/j.biortech.2009.09.006.
- Park, E. Y., Naruse, K. and Kato, T. (2012) 'One-pot bioethanol production from cellulose by co-culture of *Acremonium cellulolyticus* and *Saccharomyces cerevisiae*', *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), p. 64. doi: 10.1186/1754-6834-5-64.
- Parsell, D. A. and Lindquist, S. (1993) 'The Function of Heat-Shock Proteins in Stress Tolerance: Degradation and Reactivation of Damaged Proteins', *Annual Review of Genetics*, 27(1), pp. 437–496. doi: 10.1146/annurev.ge.27.120193.002253.
- Perez, D., Paredes, V. and Rodríguez, G. (2011) 'Biocombustibles en la Argentina y Tucumán , cifras de la industria en el período 2009-2011', in *Reporte Agroindustrial*.
- Perrone, G. G., Tan, S. X. and Dawes, I. W. (2008) 'Reactive oxygen species and yeast apoptosis', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, pp. 1354–1368. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.01.023.
- Phukoetphim, N., Salakkam, A., Laopaiboon, P. and Laopaiboon, L. (2017) 'Improvement of ethanol production from sweet sorghum juice under batch and fed-batch fermentations: Effects of sugar levels, nitrogen supplementation, and feeding regimes', *Electronic Journal of Biotechnology*, 26, pp. 84–92. doi: 10.1016/j.ejbt.2017.01.005.
- Ping, Z. H., Nguyen, Q. T., Chen, S. M., Zhou, J. Q. and Ding, Y. D. (2001) 'States of water in different hydrophilic polymers - DSC and FTIR studies', *Polymer*, 42(20), pp. 8461–8467. doi: 10.1016/S0032-3861(01)00358-5.
- Polk, A., Amsden, B., De Yao, K., Peng, T. and Goosen, M. F. A. (1994) 'Controlled release of albumin from chitosan-alginate microcapsules', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83(2), pp. 178–185. doi: 10.1002/jps.2600830213.
- Postma, E., Kuiper, A., Tomasouw, W. F., Scheffers, W. A. and Van Dijken, J. P. (1989) 'Competition for glucose between the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*', *Applied and Environmental Microbiology*, 55(12), pp. 3214–3220.
- Pronk, J. T. J. J. T., Yde Steensma, H., Van Dijken, J. P., Steensma, H. Y. H. H. Y. and Dijken, J. Van (1996) 'Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*', *Yeast*, 12(16), pp. 1607–1633. doi:

10.1002/(SICI)1097-0061(199612)12:16<1607::AID-YEA70>3.0.CO;2-4.

- Razmovski, R. and Vučurović, V. (2011) 'Ethanol production from sugar beet molasses by *S. cerevisiae* entrapped in an alginate-maize stem ground tissue matrix.', *Enzyme and microbial technology*, 48(4–5), pp. 378–85. doi: 10.1016/j.enzmictec.2010.12.015.
- Revisión, A. D. E., Folch-mallol, J. L., Garay-arroyo, A., Lledías, F. and Robles, A. A. C. (2004) 'La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*', *Shock*, 46, pp. 24–46. Available at: http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2004/mi04-1_2d.pdf.
- Ribeiro, M. G. T. C., Costa, D. a. and Machado, A. a. S. C. (2010) "'Green Star": a holistic Green Chemistry metric for evaluation of teaching laboratory experiments', *Green Chemistry Letters and Reviews*, 3(2), pp. 149–159. doi: 10.1080/17518251003623376.
- Ribeiro, M. G. T. C., Costa, D. A. and Machado, A. A. S. C. (2010) 'A Grafic Metric to a Holistic Evaluation of the Greenishness of Chemical Reactions - "Green Star".', *Quimica Nova*, 33(3), pp. 759–764. doi: 10.1590/s0100-40422010000300050.
- Rodrigues, R. C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R. and Fernández-Lafuente, R. (2013) 'Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization', *Chemical Society Reviews*, 42(15), pp. 6290–6307. doi: 10.1039/c2cs35231a.
- Roesijadi, G., Jones, S. B. and Zhu, Y. (2010) 'Macroalgae as a Biomass Feedstock : A Preliminary Analysis', *Analysis*, (September), pp. 1–50. doi: 10.2172/1006310.
- Rohleder, N., Nater, U. M., Wolf, J. M., Ehler, U. and Kirschbaum, C. (2004) 'Psychosocial stress-induced activation of salivary alpha-amylase: An indicator of sympathetic activity?', in *Annals of the New York Academy of Sciences*, pp. 258–263. doi: 10.1196/annals.1314.033.
- Roskoski, R. (2011) 'Michaelis-Menten Kinetics', in *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, pp. 1–10. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.05143-6.
- Ruis, H. and Schüller, C. (1995) 'Stress signaling in yeast', *BioEssays*, pp. 959–965. doi: 10.1002/bies.950171109.
- Ruiz-Leza, H. a, Rodriguez-Jasso, R. M., Rodriguez-Herrera, R., Contreras-Esquivel, J. C. and Aguilar, C. N. (2007) 'Bio-reactors desing for solid state fermentation', *Revista Mexicana De Ingenieria Quimica*, 6(1), pp. 33–40.
- Saini, J. K., Saini, R. and Tewari, L. (2015) 'Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments', *3 Biotech*, pp. 337–353. doi: 10.1007/s13205-014-0246-5.
- Sarker, B., Rompf, J., Silva, R., Lang, N., Detsch, R., Kaschta, J., Fabry, B. and Boccaccini, A. R. (2015) 'Alginate-based hydrogels with improved adhesive properties for cell encapsulation', *International Journal of Biological Macromolecules*, 78, pp. 72–78. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.03.061.
- Schäfer, T., Borchert, T. W., Nielsen, V. S., Skagerlind, P., Gibson, K., Wenger, K., Hatzack, F., Nilsson, L. D., Salmon, S., Pedersen, S., Heldt-Hansen, H. P., Poulsen, P. B., Lund, H., Oxenbøll, K. M., Gui, F. W., Pedersen, H. H. and Xu, H. (2006) 'Industrial enzymes', *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, pp. 59–131. doi: 10.1007/10_2006_039.
- Schieber, M. and Chandel, N. S. (2014) 'ROS function in redox signaling and oxidative stress', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034.
- Shoichet, M. S. (2010) 'Polymer scaffolds for biomaterials applications', *Macromolecules*, 43(2), pp. 581–591. doi: 10.1021/ma901530r.

- Silva, R., Fabry, B. and Boccaccini, A. R. (2014) 'Fibrous protein-based hydrogels for cell encapsulation', *Biomaterials*, pp. 6727–6738. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.04.078.
- Silva, R., Singh, R., Sarker, B., Papageorgiou, D. G., Juhasz, J. a., Roether, J. A., Cicha, I., Kaschta, J., Schubert, D. W., Chrissafis, K., Detsch, R. and Boccaccini, A. R. (2014) 'Hybrid hydrogels based on keratin and alginate for tissue engineering', *J. Mater. Chem. B*, 2(33), pp. 5441–5451. doi: 10.1039/C4TB00776J.
- Siqueira, P. F., Karp, S. G., Carvalho, J. C., Sturm, W., Rodríguez-León, J. A., Tholozan, J. L., Singhanía, R. R., Pandey, A. and Soccol, C. R. (2008) 'Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales', *Bioresource Technology*, 99(17), pp. 8156–8163. doi: 10.1016/j.biortech.2008.03.037.
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R. and Pandey, A. (2007) 'Alpha amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid-state fermentation', *Journal of Scientific and Industrial Research*, 66(8), pp. 621–626.
- Slade, R., Bauen, A. and Gross, R. (2014) 'Global bioenergy resources', *Nature Climate Change*, 4(2), pp. 99–105. doi: 10.1038/nclimate2097.
- Smart hydrogels* (no date). Available at: <http://maogroup.jhu.edu/projects/>.
- Smirnova, J., Fernie, A. R. and Steup, M. (2015) 'Starch degradation', in *Starch: Metabolism and Structure*, pp. 239–290. doi: 10.1007/978-4-431-55495-0_7.
- Solis-Pereyra, S., Favela-Torres, E., Gutiérrez-Rojas, M., Roussos, S., Saucedo-Castañeda, G., Gunasekaran, P. and Viniegra-González, G. (1996) 'Production of pectinases by *Aspergillus niger* in solid state fermentation at high initial glucose concentrations.', *World journal of microbiology & biotechnology*, 12(Miller), pp. 257–60. doi: 10.1007/BF00360924.
- Stanley, D., Bandara, A., Fraser, S., Chambers, P. J. and Stanley, G. A. (2010) 'The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Applied Microbiology*, pp. 13–24. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04657.x.
- Stevens, M. M., Qanadilo, H. F., Langer, R. and Shastri, V. P. (2004) 'A rapid-curing alginate gel system: Utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering', *Biomaterials*, 25(5), pp. 887–894. doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.07.002.
- Sthle, L. and Wold, S. (1989) 'Analysis of variance (ANOVA)', *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, pp. 259–272. doi: 10.1016/0169-7439(89)80095-4.
- Strober, W. (2001) 'Trypan blue exclusion test of cell viability', *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]*, Appendix 3, p. Appendix 3B. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs21.
- Sun, J. and Tan, H. (2013) 'Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications', *Materials*, pp. 1285–1309. doi: 10.3390/ma6041285.
- Sun, J., Wei, D., Zhu, Y., Zhong, M., Zuo, Y., Fan, H. and Zhang, X. (2014) 'A spatial patternable macroporous hydrogel with cell-affinity domains to enhance cell spreading and differentiation', *Biomaterials*, 35(17), pp. 4759–4768. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.02.041.
- Talking, J., Bastidas, O., Name, L., Name, F., Training, O., Training, P., Darin, C., Training, R. O., Kimberly, M., Deepa, G., Board, E., Principal, E., Primary, I., Systems, F., Study, E. B., Co-investigator, N. and Quesada, J. P. F. (2014) 'Cell Counting with Neubauer Chamber Basic Hemocytometer Usage', *Tesis de maestría*, (1), pp. 1–444. doi: 10.1007/s13398-014-0173-7.2.
- Tang, S. C. N., Wang, P., Yin, K. and Lo, I. M. C. (2010) 'Synthesis and application of magnetic hydrogel for Cr(VI) removal from contaminated water', *Environmental Engineering Science*, 27(11), pp. 947–

954. doi: 10.1089/ees.2010.0112.
- Terrádez, M. and Juan, A. a. (2010) 'Análisis de la varianza (anova)', *UOC.edu*, (1), pp. 1–18. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Tester, R. F., Karkalas, J. and Qi, X. (2004) 'Starch - Composition, fine structure and architecture', *Journal of Cereal Science*, pp. 151–165. doi: 10.1016/j.jcs.2003.12.001.
- Thatipamala, R., Rohani, S. and Hill, G. A. (1992) 'Effects of high product and substrate inhibitions on the kinetics and biomass and product yields during ethanol batch fermentation', *Biotechnology and Bioengineering*, 40(2), pp. 289–297. doi: 10.1002/bit.260400213.
- Thudi, L., Jasti, L. S., Swarnalatha, Y., Fadnavis, N. W., Mulani, K., Deokar, S. and Ponrathnam, S. (2012) 'Enzyme immobilization on epoxy supports in reverse micellar media: Prevention of enzyme denaturation', *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74(1–2), pp. 54–62. doi: 10.1016/j.molcatb.2011.08.014.
- Tischer, W. and Wedekind, F. (1999) 'Immobilized Enzymes: Methods and Applications', *Biocatalysis-from discovery to application*, 200, pp. 95–126. doi: 10.1007/3-540-68116-7.
- Tobiszewski, M., Mechlińska, A. and Namieśnik, J. (2010) 'Green analytical chemistry--theory and practice.', *Chemical Society reviews*, 39, pp. 2869–2878. doi: 10.1039/b926439f.
- Toledano, M. B., Delaunay, A., Biteau, B. and Spector, D. (2003) 'Oxidative stress responses in yeast', *Yeast Stress Responses*, 1, pp. 242–87. doi: 10.1007/3-540-45611-2_6.
- Tronchoni, J., Gamero, A., Arroyo-López, F. N., Barrio, E. and Querol, A. (2009) 'Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation', *International Journal of Food Microbiology*, 134(3), pp. 237–243. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.004.
- Valero-Valdivieso, M. F., Ortégón, Y. and Uscategui, Y. (2013) 'Biopolímeros: Avances y perspectivas', *DYNA (Colombia)*, 80(181), pp. 171–180. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84886920313&partnerID=tZOTx3y1>.
- Vernier (2006) 'Acción Enzimática: Actividad de la Catalasa', *Ciencias con lo mejor de Vernier*, pp. 1–8. Available at: www2.vernier.com/sample_labs/CMV-03-enigma.pdf.
- Vidales, R. N. (1993) 'Ciclo celular', *La Ricerca Folklorica*, 2, pp. 1–9. doi: 10.2307/1479748.
- Wang, T., Weng, Y., Qiu, S., Long, J., Chen, L., Li, K., Liu, Q., Zhang, Q. and Ma, L. (2015) 'Gasoline Production by One-pot Catalytic Conversion of Lignocellulosic Biomass Derived Sugar/Polyol', in *Energy Procedia*, pp. 773–778. doi: 10.1016/j.egypro.2015.07.512.
- Wichterle, O. and Lím, D. (1960) 'Hydrophilic Gels for Biological Use', *Nature*, 185(4706), pp. 117–118. doi: 10.1038/185117a0.
- Wilson, K. (2010) *Enzymes, Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*.
- Wu, J. Y., Liu, S. Q., Heng, P. W. S. and Yang, Y. Y. (2005) 'Evaluating proteins release from, and their interactions with, thermosensitive poly (N-isopropylacrylamide) hydrogels', *Journal of Controlled Release*, 102(2), pp. 361–372. doi: 10.1016/j.jconrel.2004.10.008.
- Xu, R., Zhou, Q., Li, F. and Zhang, B. (2013) 'Laccase immobilization on chitosan/poly(vinyl alcohol) composite nanofibrous membranes for 2,4-dichlorophenol removal', *Chemical Engineering Journal*, 222, pp. 321–329. doi: 10.1016/j.cej.2013.02.074.
- Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D. H. and Zheng, C. (2007) 'Characteristics of hemicellulose, cellulose

- and lignin pyrolysis', *Fuel*, 86(12–13), pp. 1781–1788. doi: 10.1016/j.fuel.2006.12.013.
- Yang, R., Su, M., Li, M., Zhang, J., Hao, X. and Zhang, H. (2010) 'One-pot process combining transesterification and selective hydrogenation for biodiesel production from starting material of high degree of unsaturation', *Bioresource Technology*, 101(15), pp. 5903–5909. doi: 10.1016/j.biortech.2010.02.095.
- Ylittero, P., Franzén, C. J. and Taherzadeh, M. J. (2011) 'Ethanol production at elevated temperatures using encapsulation of yeast', *Journal of Biotechnology*, 156(1), pp. 22–29. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.07.018.
- Zhang, M., Wang, F., Su, R., Qi, W. and He, Z. (2010) 'Ethanol production from high dry matter corncob using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation after combined pretreatment', *Bioresource Technology*, 101(13), pp. 4959–4964. doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.010.
- Zhao, X. Q. and Bai, F. W. (2009) 'Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production', *Journal of Biotechnology*, pp. 23–30. doi: 10.1016/j.jbiotec.2009.05.001.
- Zhaoxin, L., Fengxia, L., Xiaomei, B. and Fujimura, T. (2002) 'Immobilization of yeast cells with polymeric carrier cross-linked using radiation technique', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), pp. 2798–2801. doi: 10.1021/jf010860e.
- Zumbado Rivera, W., Esquivel, P. and Wong, E. (2006) 'Selección de una levadura para la producción de biomasa: crecimiento en suero de queso', *Agronomía Mesoamericana*, pp. 151–160. Available at: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5039970&info=resumen&idioma=SPA>.